



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL CONSUMO DE NOPAL (*OPUNTIA FICUS-INDICA*)
EN UN MODELO DE OBESIDAD (ZUCKER FA/FA):
EFECTO SOBRE EL DESARROLLO DE ESTEATOSIS HEPÁTICA**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA: SOFÍA MORÁN RAMOS

DIRECTORA DE TESIS
DRA. NIMBE TORRES Y TORRES
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

COMITÉ TUTOR
DRA. VICTORIA CHAGOYA HAZAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. MARZO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

GRACIAS

Esta tesis fue dirigida por la

Dra. Nimbe Torres y Torres

Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Comité tutorial:

Dra. Victoria Chagoya Hazas

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. José Pedraza Chaverri

Facultad de Química, UNAM

El trabajo fue realizado gracias al patrocinio de:

- Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACYT)
- Instituto de Ciencia y Tecnología del DF (ICyTDF)
- Fundación Produce
- Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM (DGEP)
- Laboratorio de la Dra. Helen Raybould, Universidad de California, Davis
- Fondo Nestlé para la Nutrición

El estudio en ratas Zucker fue realizado con la participación de:

LN. Patricia López Romero
Fisiología de la Nutrición, INCMNSZ

Med. Cir. Nashla Hamdan Pérez
Cirugía experimental, INCMNSZ

La determinación del nopal fue realizada por:

MenC. Carlos Gomez Hinostrosa
Instituto de Ecología, UNAM

La evaluación del estrés oxidante se llevó a cabo en colaboración con:

Dr. José Pedraza Chaverri
Facultad de Química, UNAM

Q.A. Azalia Ávila Nava
Facultad de Química, UNAM

El estudio en ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa se realizó en colaboración con:

Dra. Helen Raybould
Department of Anatomy, Physiology and Cell Biology
University of California, Davis

El nopal usado en los tres estudios fue amablemente donado por:

Dr. Esteban Olvera
Milpa Alta, México

INDICE

RESUMEN	12
ABSTRACT	14
INTRODUCCION	16
A. Nopal	16
A.1. Composición química	16
A.2. Compuestos bioactivos del nopal	17
A.3. Efectos fisiológicos del consumo del nopal	19
B. Obesidad	20
B.1.0. Alteraciones metabólicas derivadas de la obesidad	21
B.2.0. Metainflamación	21
B.3.0. Resistencia a la insulina	22
B.4.0. Esteatosis hepática	22
B.4.1. Fisiopatología de la esteatosis hepática	23
B.4.2. Resistencia a la insulina y esteatosis hepática	24
B.4.3. Adipocinas	25
B.4.4. Estrés oxidante	26
B.4.5. Metabolismo de lípidos y esteatosis hepática	27
B.4.6. Nutrición y esteatosis hepática	30
B.5.0. Obesidad esteatosis hepática y fisiología intestinal	31
B.5.1. Inflamación intestinal y obesidad	32
B.5.2. Permeabilidad intestinal	32
B.5.3. Nutrición y fisiología intestinal	33

C. Modelo animal de obesidad “Rata Zucker (<i>fa/fa</i>)	34
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
RELEVANCIA E IMPACTO	36
HIPÓTESIS	37
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
DISEÑO EXPERIMENTAL	39
METODOLOGÍA	42
A. Caracterización del nopal	42
A.1. Preparaciones de nopal	42
A.2. Determinación del nopal	42
A.3. Análisis químico	42
A.4. Extracción de polifenoles	43
A.5. Identificación de los polifenoles presentes en el nopal	43
B. Estudios in vivo	44
B.1. Estudio piloto en rata Zucker (<i>fa/fa</i>)	44
B.1.1. Diseño experimental	44
B.1.2. Descripción de la dieta	45
B.1.3. Curva oral de tolerancia a la glucosa e índice de HOMA-IR	46
B.1.4. Determinación de glucosa e insulina y perfil de lípidos en suero	46
B.1.5. Análisis histomorfológico del hígado	46
B.2. Estudio crónico 1 en ratas Zucker (<i>fa/fa</i>)	47
B.2.1. Diseño experimental	47

B.2.2. Descripción de la dieta	47
B.2.3. Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales en suero	48
B.2.4. Determinación de lipoproteínas en suero	48
B.2.5. Determinación de lípidos en hígado	49
B.2.6. Determinación de marcadores de daño hepático en suero	49
B.2.7. Extracción y cuantificaciones de proteínas totales en hígado	50
B.2.8. Extracción y cuantificaciones de proteínas mitocondriales en hígado	50
B.2.9. Electroforesis, transferencia y bloqueo	50
B.2.10. Inmunodetección	51
B.2.11. Revelado y semicuantificación	52
B.2.12. Extracción de ARN y cuantificación	52
B.2.13. Síntesis de cDNA por la reacción de transcriptasa reversa	52
B.2.14. Reacción de PCR en tiempo real y cuantificación relativa	52
B.3. Estudio agudo en ratas Zucker (<i>fa/fa</i>)	53
B.3.1. Diseño experimental	53
B.3.2. Curva oral de tolerancia a los lípidos	54
B.3.3. Curva de absorción de lípidos	54
B.4. Estudio crónico 2, en ratas Zucker (<i>fa/fa</i>)	54
B.4.1. Diseño experimental	54
B.5. Estudio crónico 3, en ratas Sprague Dawley	55
B.5.1. Diseño experimental	55
B.5.2. Descripción de la dieta	56
B.5.3. Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales en suero	56
B.5.4. Determinación de permeabilidad intestinal	57
B.5.5. Análisis histológico de yeyuno y tejido adiposo	57
B.5.6. Determinación de especies reactivas de oxígeno	57

B.5.7. Determinación de la actividad enzimática de la mieloperoxidasa	58
C. Análisis estadístico	58
RESULTADOS	60
A) Estandarización del modelo	60
A.1. Ingesta de alimento y peso corporal	60
A.2. Parámetros bioquímicos	60
A.2.1. Curvas de tolerancia oral a la glucosa	61
A.2.2. Glucosa e insulina	62
A.2.3. Triglicéridos y colesterol	62
A.3. Histomorfología	63
B. Efecto del consumo de nopal sobre el desarrollo de esteatosis hepática en ratas Zucker (fa/fa). Estudio crónico 1.	64
B.1. Ingesta de alimento, peso corporal y peso de hígado	64
B.2. Parámetros bioquímicos	66
B.2.1. Curvas de tolerancia oral a la glucosa	66
B.2.2. Glucosa, insulina y glucagon	67
B.2.3. Perfil de lípidos	69
B.2.3.1. Triglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres	69
B.2.3.2. Lipoproteínas (VLDL y LDL)	70
B.2.4. Adiponectina	71
B.2.5. Cuerpos cetónicos (β -hidroxibutirato)	72
B.2.6. Marcadores de daño hepático (ALT y AST)	73
B.3. Metabolismo de lípidos en hígado	73

B.3.1. Histomorfología	73
B.3.2. Triglicéridos y colesterol hepáticos	74
B.3.3. Expresión de genes y de proteína involucrados en el metabolismo de lípidos	75
B.3.3.1. Captura de ácidos grasos	75
B.3.3.2. Síntesis de lípidos	76
B.3.3.3. Oxidación de lípidos	77
B.3.3.4. Síntesis y exportación de lipoproteínas	79
B.4. Señalización de insulina en hígado	80
B.4.1. Fosforilación de IRS1 y Akt	80

C. Estudio del consumo de nopal sobre la absorción de lípidos a nivel intestinal en la rata

Zucker (<i>fa/fa</i>): relación con la esteatosis hepática.	81
C.1. Estudio agudo 1.	81
C.1.1. Curva de absorción de lípidos	81
C.2. Estudio crónico 2.	82
C.2.1. Ingesta de alimento, peso corporal y peso de tejidos	82
C.2.2. Parámetros bioquímicos	83
C.2.2.1. Curvas de lípidos	83
C.2.2.2. Insulina	84

D. Efecto del consumo de nopal sobre el desarrollo de adiposidad y la fisiología gastrointestinal en ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa.

Estudio crónico 3.	85
D.1. Ingesta de alimento y ganancia de peso	85
D.2. Adiposidad y parámetros asociados	86

D.2.1. Peso relativo de los diferentes compartimentos	86
D.2.2. Área media de los adipocitos (subcutáneo y mesentérico)	87
D.3. Parámetros bioquímicos en suero	89
D.3.1. Glucosa, triglicéridos y colesterol	89
D.3.2. Adipocinas en suero	90
D.4. Fisiología intestinal	92
D.4.1 Yeyuno: Morfología intestinal	92
D.4.2. Íleon: Permeabilidad intestinal	93
D.4.3. Ciego	94
D.4.4. Colon	96
DISCUSIÓN	97
CONCLUSIONES	108
PERSPECTIVAS	109
REFERENCIAS	110

ANEXOS

- I) Efecto del consumo de nopal sobre parámetros de estrés oxidante en el hígado de ratas Zucker (*fa/fa*) obesas; relación con la esteatosis hepática
- II) Moran-Ramos, S., Avila-Nava, A., Tovar, AR., Pedraza-Chaverri, J., Lopez-Romero, P., Torres N., (2012) *Opuntia ficus indica* (Nopal) Attenuates Hepatic Steatosis and Oxidative Stress in Obese Zucker (*fa/fa*) Rats, *Journal of Nutrition*, 142: 1956–1963.
- III) Moran-Ramos S., Tovar AR., Torres N., (2012): Friend or foe of enteroendocrine cells: How it interacts with enteroendocrine cells, *Advances in Nutrition*, 3: 8–20
- IV) Ejemplar de *Opuntia ficus indica* en el Herbario del Instituto de Ecología, UNAM.

Índice de figuras	Pag.
INTRODUCCIÓN	
Figura 1. Estructura de los principales polifenoles contenidos en el nopal	18
Figura 2. Diagrama de las posibles fuentes y mecanismos de la acumulación de lípidos en hígado	24
Figura 3. Mecanismos por lo cuales la acumulación de lípidos en hígado, la inflamación, y la especies reactivas de oxígeno contribuyen al daño hepático en esteatosis hepática no alcohólica	27
Figura 4. El desequilibrio entre la captura, síntesis, oxidación y exportación de ácidos grasos en hígado puede llevar al desarrollo de esteatosis hepática	30
METODOLOGÍA	
Figura 5. Cromatograma representativo de la extracción de polifenoles de nopal	44
RESULTADOS	
Estudio Piloto	
Figura 6. Peso corporal e ingesta de alimento	60
Figura 7. Curvas de tolerancia oral a la glucosa antes y después de la intervención dietaria.	61
Figura 8. Valores de glucosa e insulina en suero	62
Figura 9. Valores de colesterol y triglicéridos, en suero	63
Figura 10. Análisis histológico de los hígados de las ratas alimentadas con Nopal o la dieta control	64
Efecto del consumo de nopal sobre el desarrollo de esteatosis hepática en ratas Zucker (fa/fa). Estudio crónico 1	
Figura 11. Peso corporal e ingesta de alimento	65
Figura 12. Peso de hígados en función del peso corporal	66
Figura 13. Curvas de tolerancia oral a la glucosa antes y después de la intervención dietaria	67
Figura 14. Valores de glucosa, insulina y glucagon en suero	68
Figura 15. Valores de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres en suero	70

Figura 16. Valores de las diferentes subclases de lipoproteínas en suero	71
Figura 17. Valores de adiponectina total en suero de las ratas en ayuno y Postprandio	72
Figura 18. Valores de β -hidroxibutirato en suero de las ratas en ayuno y Postprandio	72
Figura 19. Pruebas de daño hepático en suero	73
Figura 20. Análisis histológico de los hígados de las ratas alimentadas con nopal o la dieta control	74
Figura 21. Valores de Colesterol y triglicéridos hepáticos	75
Figura 22. Expresión del transportador de ácidos grasos CD36 en hígado	76
Figura 23. Expresión de proteína involucradas en lipogénesis en hígado	77
Figura 24. Expresión de genes y proteínas involucrados en la oxidación de lípidos en hígado	78
Figura 25. Expresión de enzimas involucradas en empaquetamiento de Lipoproteínas	79
Figura 26. Relación de proteína pAkt/Akt total y pIRS/IRS1 total evaluado por western blot	80

Estudio del consumo de nopal sobre la absorción de lípidos a nivel intestinal en la rata Zucker (*fa/fa*): relación con la esteatosis hepática

Figura 27. Curva de absorción de lípidos, estudio agudo.	81
Figura 28. Peso de corporal e ingesta de alimento	82
Figura 29. Peso de hígados y de los diferentes compartimentos del tejido adiposo en función del peso corporal	83
Figura 30. Curvas de absorción de lípidos	84
Figura 31. Valores de insulina en plasma de ratas en ayuno (muestras basales de la curva de lípidos)	85

Efecto del consumo de nopal sobre el desarrollo de adiposidad y la fisiología gastrointestinal en ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa. Estudio crónico 3

Figura 32. Peso de corporal e ingesta de alimento	86
Figura 33. Peso relativo del tejido adiposo blanco	87

Figura 34. Análisis histológico de secciones de tejido adiposo mesentérico y cuantificación del área media del adipocito	88
Figura 35. Análisis histológico de secciones de tejido adiposo subcutáneo y cuantificación del área media del adipocito	89
Figura 36. Valores de glucosa, triglicéridos y colesterol en suero	90
Figura 37. Valores de leptina y adiponectina total en suero de las ratas en Ayuno	91
Figura 38. Histologías representativas de secciones de yeyuno y largo de las vellosidades	93
Figura 39. Evaluación de la permeabilidad intestinal en secciones de íleon	94
Figura 40. Peso del tejido y contenido del ciego	94
Figura 41. Correlación entre el peso del ciego y la adiposidad	95
Figura 42. Efecto del consumo de nopal sobre marcadores de inflamación y especies reactivas de oxígeno en el ciego	96
Figura 43. Efecto del consumo de nopal sobre marcadores de inflamación y especies reactivas de oxígeno en el colon	96

CONCLUSIONES

Figura 44. Efecto del consumo de nopal en la esteatosis hepática e un modelo de obesidad, la rata Zucker (<i>fa/fa</i>)	107
--	-----

Índice de tablas	Pag.
Tabla 1. Composición promedio del nopal	16
Tabla 2. Composición química del nopal deshidratado por calor	43
Tabla 3. Formulación de las dietas experimentales, estudio piloto	45
Tabla 4. Deshidratación y embebido de tejidos en parafina	46
Tabla 5. Formulación de las dietas experimentales	48
Tabla 6. Parámetros de lipoproteínas reportadas	49
Tabla 7. Anticuerpos y condiciones utilizadas para la inmunodetección	51
Tabla 8. Genes analizados y no. de catalogo de sondas Taqman	53
Tabla 9: Formulación de las dietas experimentales, estudio en ratas alimentadas con dieta alta en grasa	56

RESUMEN

Opuntia ficus indica (nopal) es una cactácea ampliamente consumida en la dieta mexicana. El nopal se considera un alimento funcional por su alto contenido de fibra dietaria y polifenoles así como por su actividad antioxidante.

La acumulación excesiva de grasa en el hígado en ausencia del consumo de alcohol (esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD)) se observa en 25-30% de los adultos en países industrializados y se considera la enfermedad hepática más común. NAFLD es un término que describe un amplio espectro de anormalidades hepáticas caracterizadas en un principio por la acumulación de triglicéridos en el hígado o esteatosis hepática y está asociado con múltiples factores tales como obesidad, resistencia a la insulina y estrés oxidante. Actualmente no existe ningún fármaco para la prevención o el tratamiento de NAFLD, y son únicamente los cambios en el estilo de vida tales como la dieta, las alternativas aceptadas para el tratamiento de esta enfermedad.

Considerando la creciente epidemia de obesidad en México, y el riesgo que implica en el desarrollo de NAFLD, es muy importante la búsqueda de intervenciones dietarias que puedan ayudar a la prevención o el tratamiento de esta enfermedad.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del consumo de nopal en el desarrollo de esteatosis hepática y resistencia a la insulina en ratas Zucker (*fa/fa*) obesas, un modelo de esteatosis hepática y síndrome metabólico.

Las ratas alimentadas con nopal, en comparación con las ratas control, presentaron una reducción del 50% en la acumulación de triglicéridos hepáticos así como una reducción en la hepatomegalia y en algunos marcadores de daño hepático tales como los niveles séricos de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa. Adicionalmente, presentaron una reducción significativa en los marcadores de estrés oxidante en hígado.

A pesar de que no se observaron diferencias entre las dietas en la resistencia periférica a la insulina, característica de este modelo, las ratas alimentadas con nopal presentaron menores valores de insulina postprandial y un incremento en la fosforilación postprandial de las proteínas IRS y Akt, involucradas en la señalización de insulina. Los resultados anteriores sugieren una mejora en la señalización a la insulina en hígado.

Aunado a estos resultados, las ratas alimentadas con nopal presentaron mayores valores de adiponectina en suero, una mayor expresión del ARN mensajero de algunos genes involucrados en la oxidación y exportación de ácidos grasos así como un incremento en la abundancia de las proteínas carnitina palmitoil transferasa 1, y la proteína microsomal para transferencia de triglicéridos.

Este estudio sugiere que el consumo de nopal atenúa la esteatosis hepática en las ratas Zucker (*fa/fa*) obesas, posiblemente a través de un incremento en la oxidación de ácidos grasos, una mayor exportación de ácidos grasos a través de la síntesis de VLDLs, una disminución en el estrés oxidante y una mejora en la señalización a la insulina en hígado.

Un segundo objetivo del proyecto fue extender el conocimiento sobre los efectos fisiológicos del consumo de nopal en modelos de obesidad. En ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa, el consumo de nopal atenuó el desarrollo de adiposidad así como la hipertrofia de los adipocitos subcutáneos. En paralelo el consumo de nopal incremento el peso del ciego y su contenido, disminuyó la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en ciego y la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO) en esta sección intestinal. Se encontró una asociación significativa entre el peso del ciego y su contenido con el porcentaje de adiposidad. Considerando el papel del ciego como bioreactor, en donde ocurre la mayor fermentación intestinal, es posible sugerir un posible enlace entre lo que esta sucediendo en el intestino y el desarrollo de adiposidad. Sin embargo aún se requieren mas estudios.

El presente trabajo aporta evidencia de que el consumo de nopal atenúa el desarrollo de esteatosis hepática en la rata Zucker (*fa/fa*) obesa. Adicionalmente el estudio realizado en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa aporta evidencia de los potenciales beneficios del nopal contra el desarrollo de adiposidad y anormalidades relacionadas con la misma.

ABSTRACT

Opuntia ficus indica (nopal) is a cactus plant that is widely consumed in the Mexican diet. It is considered a functional food because of its high dietary fiber and polyphenol concentration as well as its antioxidant activity.

The excessive accumulation of fat in the liver in the absence of alcohol consumption [nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)] is observed in 25–30% of adults in industrialized countries and is the most common type of liver disease. NAFLD is a term that describes a spectrum of hepatic abnormalities characterized primarily by TG accumulation in the liver or hepatic steatosis and is associated with multiple factors such as obesity, insulin resistance, and oxidative stress. Currently there is no pharmacological treatment to prevent or treat NAFLD, and lifestyle changes such as diet are the considered the best approach.

Considering the growing epidemic of obesity in Mexico, and the risk that implies for the development of NAFLD, it is very important to find dietary interventions that could ameliorate the development of this disease.

The aim of the present work was to evaluate the effect of nopal consumption on the development of hepatic steatosis and insulin resistance in obese Zucker rats, a well-known model of fatty liver and metabolic syndrome.

Rats fed the nopal-containing diet had 50% lower hepatic TG than the control group as well as a reduction in hepatomegaly and biomarkers of hepatocyte injury such as serum alanine and aspartate aminotransferases activities. In addition nopal fed rats showed a significant reduction in hepatic oxidative stress biomarkers. Although no differences were observed in the characteristic peripheral insulin resistance between the two diets, rats fed the nopal diet had a lower postprandial serum insulin concentration and a greater liver phosphorylated protein kinase B (pAKT):AKT and pIRS:IRS ratio in the postprandial state. The latter suggest that there was an improvement in hepatic insulin signaling.

Attenuation of hepatic steatosis by nopal consumption was accompanied by a higher serum concentration of adiponectin and a greater abundance of mRNA for genes involved in lipid oxidation and lipid export and production of carnitine palmitoyltransferase- 1 and microsomal TG transfer proteins in liver.

This study suggests that nopal consumption attenuates hepatic steatosis most likely by increasing fatty acid oxidation and export via VLDL synthesis, decreasing oxidative stress, and improving liver insulin signaling in obese Zucker (fa/fa) rats.

A second aim of the study was to extend the knowledge of the physiological effects of nopal consumption in obesity models. In Sprague-Dawley rats fed a high fat diet, nopal consumption significantly attenuated the development of adiposity and the hypertrophy in subcutaneous adipocytes. In parallel, nopal consumption increased the cecum weight and content and decreased the activity of mieloperoxidase as well as reactive oxygen species in the cecum of high fat fed rats. There was a significant association between the degree of adiposity and the weight of the cecum and cecum content. Considering that the cecum is considered as a bioreactor because it is where most of the intestinal fermentation occurs, it is possible to suggest that there is a link between what is occurring in the cecum and the development of adiposity. However the later requires further research.

The current study provides evidence that nopal consumption attenuates the development of NAFLD in the obese Zucker (fa/fa) rats. In addition the study in rats fed a high fat diet shows the potential benefits of nopal consumption in the development of adiposity and related abnormalities.

INTRODUCCIÓN

A. Nopal

El nopal es una cactácea característica de zonas áridas y semi aridas que pertenece al género *Opuntia sp.* (subfamilia Opuntioideae, familia Cactaceae) (1). Esta planta crece de manera natural en diversas partes del mundo tales como el Mediterráneo, partes de Asia y el norte, centro y sur de América. Actualmente los lugares donde se cultiva de manera comercial son México, Italia, Chile y California, entre otros. Sin embargo la mayoría de estos lugares utilizan el fruto de esta planta (tuna) para consumo humano y en algunos casos la planta (cladodios) como forraje y para otras aplicaciones (2). Son solo algunos lugares como México en donde los cladodios o nopales se utilizan también para consumo humano.

En México el cultivo de nopal se ha llevado a cabo desde tiempos prehispánicos y junto con el fruto de esta planta; la tuna, forman parte importante tanto de la dieta como de la agricultura (3, 4).

A.1. Composición química

La composición química del nopal (*Opuntia*) varía considerablemente en función de las condiciones edáficas, la variedad y la etapa estacional entre otros factores. Diversos estudios han descrito la composición química de diferentes variedades de nopal, y han observado que la composición varía también en función de la etapa de maduración de la planta. Por lo tanto, resumir su composición química se vuelve un tanto complejo.

La composición básica del nopal de acuerdo con diversos estudios se encuentra resumida en la tabla 1 (1, 4, 5).

Tabla 1. Composición promedio del nopal (sin espinas). Recopilado de (1, 4, 5). NR = No reportado.

	Base seca (g/100 g)	Base húmeda (g/100 g)	Nopal deshidratado (g/100 g)
Agua	—	88-95	4 - 8
Carbohidratos	64 - 71	3-7	40 – 60
Fibra cruda	18	1 - 2	11 – 24
Fibra soluble	NR	NR	14 – 26
Fibra insoluble	NR	NR	29 – 42
Proteínas	4 -10	0.5 - 1	11- 14

Lípidos	1 - 4	0.2	1 - 3
Cenizas	19 - 23	1 - 2	17 - 24

Como se puede observar en la tabla 1, el nopal fresco contiene una gran cantidad de agua. El resto de los componentes son en su mayoría carbohidratos, fibra dietaria, proteínas y en mucho menor cantidad lípidos. Es claro que el rango de los componentes mencionados anteriormente es bastante amplio en la mayoría de los casos, lo cual es consecuencia de la amplia variabilidad en la composición química del nopal en función de la variedad, clima, maduración etc.

A.2. Compuestos bioactivos del nopal

El nopal desde hace muchos años se ha utilizado en medicina popular para el tratamiento y prevención de algunas enfermedades, por esta y otras razones diversos estudios se han dedicado a caracterizar y cuantificar los compuestos bioactivos del nopal. Estos estudios han destacado la presencia de vitaminas, calcio, polisacáridos (fibra dietaria) y polifenoles como los principales compuestos bioactivos.

Las vitaminas que se han reportado como parte de la composición del nopal, son principalmente la vitamina C (ácido ascórbico) y los beta carotenos (precursores de vitamina A). Es importante mencionar que aunque el ácido ascórbico se encuentra en concentraciones de hasta 2 mg/g con procesos de deshidratación tales como el secado por calor esta cantidad se reduce considerablemente (6).

El contenido de calcio por su parte en el nopal deshidratado es considerable (17-34 mg/g) y se ha observado que aumenta con la maduración del cladodio, alcanzando un máximo en los nopales de 250 g (5). Sin embargo también se ha descrito que aunque el contenido de oxalatos disminuye en función de la maduración, su presencia hace que este calcio sea poco biodisponible (7).

El contenido de polisacáridos le da especial importancia a nivel nutricional por el contenido de fibra soluble e insoluble, que han sido asociados con un efecto antihiper glucemiante e hipocolesterolémico y por otro lado tienen también un interés comercial por sus propiedades reológicas usadas en la industria (8).

Los polisacáridos contenidos en el nopal son compuestos poliméricos, con estructuras complejas y altamente ramificadas responsables de su gran capacidad de retención de agua. Aunque la composición de estos polisacáridos varía dependiendo de la etapa estacional de cosecha y las condiciones edáficas entre otras, se ha observado que de manera general estos

están compuestos básicamente de arabinosa, galactosa, ramnosa, xilosa, glucosa y ácido galacturónico. Aunque la proporción de los monosacáridos anteriores cambie (1, 9-11) se ha descrito que la estructura que forman estas unidades es una cadena “core” con enlaces 1-4 de ácido galacturónico y $\alpha(1-2)$ de ramnosa con ramificaciones de trisacáridos de $\beta(1-6)$ galactosa unidas al oxígeno de los residuos de ramnosa.

Por otro lado se ha propuesto que por su estructura los polisacáridos del nopal pueden dividirse en dos fracciones; pectina con propiedades gelificantes e interacciones con calcio y el mucílago, el cual no presenta las propiedades anteriores pero si contribuye a las propiedades reológicas. (12, 13)

Finalmente el contenido de polifenoles, que es variable en función de la especie, es de gran interés pues se ha demostrado que algunos polifenoles (contenidos en frutas y verduras) tienen efectos interesantes tanto en modelos animales como *in vitro* que pudieran estar asociados a la prevención de enfermedades crónico degenerativas como cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas (14, 15) entre otras. Los polifenoles que se han encontrado en diversas variedades de nopal son ácidos fenólicos y flavonoides (16), de estos los principales pertenecen a la familia de los flavonoides y son quercetina, isorhamnetina y kaempferol. Estos flavonoides se han encontrado tanto en forma de aglicona como en glicósidos, sin embargo estos últimos son los más abundantes. Aunque la proporción de estos polifenoles varía en función de la variedad de nopal de manera general se ha encontrado en mayor abundancia la isorhamnetina, después el kaempferol y por último la quercetina (1, 9). Al igual que con la vitamina C, en algunos se ha descrito que el método de deshidratación y la temperatura disminuye la concentración de los mismos (6).

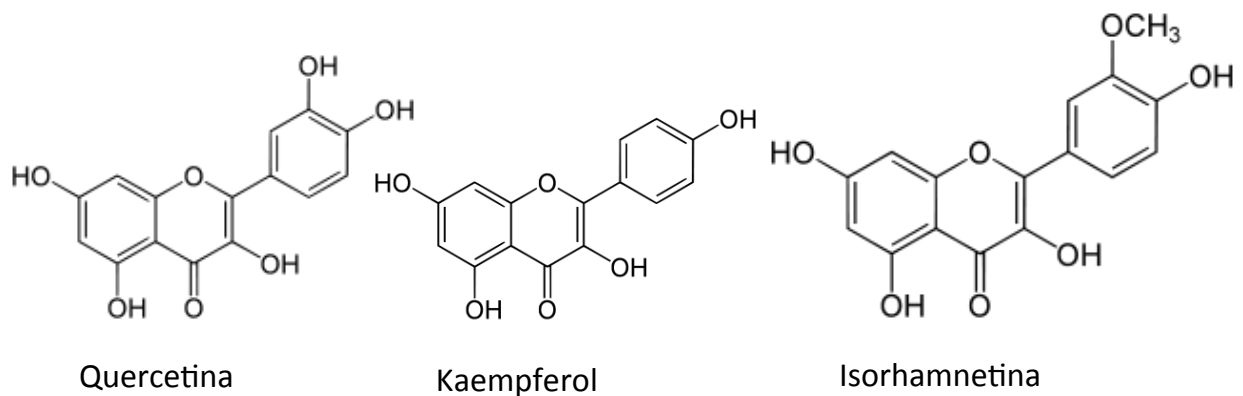


Figura 1. Estructura de los principales polifenoles contenidos en el nopal.

A.3. Efectos fisiológicos del consumo de nopal

El consumo de nopal históricamente se ha asociado con ciertos beneficios a la salud y desde hace muchos años se ha utilizado en la medicina popular mexicana para el tratamiento de diabetes e hipercolesterolemia entre otras enfermedades (17).

Existe cierta evidencia de estos efectos ya que hace algunos años en estudios realizados por Frati y colaboradores, encontraron efectos benéficos del consumo agudo de nopal en pacientes diabéticos (18). Estudios mas recientes mostraron una mejora en los niveles de glucosa en el suero de ratas con diabetes tipo 1 (inducidas por streptozotocina) con la administración tanto de un extracto de polisacáridos de nopal, como de extractos de nopal obtenidos con solventes orgánicos (19, 20). Adicionalmente, en pacientes diabéticos tipo 2, la ingesta de 300 g de nopal al vapor junto con un desayuno alto en carbohidratos o con proteína de soya incrementó significativamente la capacidad antioxidante del suero. En este mismo estudio, la ingesta de nopal junto con el desayuno con proteína de soya redujo significativamente la secreción postprandial de GIP, en comparación con el desayuno solo (21). Guevara-Cruz y colaboradores demostraron en pacientes con síndrome metabólico que un portafolio dietario o conjunto de alimentos que contenía, nopal, proteína de soya, beta glucanos y chía era capaz de disminuir los triglicéridos en suero, la proteína C reactiva y mejorar la tolerancia a la glucosa después de 2 meses de intervención (22).

Por otro lado, los efectos hipocolesterolémicos se investigaron hace algunos años en un modelo de hipercolesterolemia (cobayos) en donde se observó que el consumo de pectina de nopal disminuía significativamente las concentraciones de colesterol total y LDL, sin modificar la absorción intestinal de colesterol (23). La disminución en los niveles de colesterol se atribuyó a una reducción en los niveles de colesterol hepático que a su vez modifica el recambio o procesamiento de las partículas LDL en hígado (24). Mas recientemente se observó que la administración de un extracto de polisacáridos de una variedad de nopal (*Opuntia dillenii*) prevenía el incremento en los niveles de colesterol en suero, así como la peroxidación lipídica inducida por un bolo de lípidos administrado de manera crónica (25).

Adicionalmente, en otros estudios en modelos animales e *in vitro* se han descrito propiedades antiinflamatorias, coadyuvantes en el proceso de curación de heridas y neuroprotectoras con el uso de diversos extractos de nopal. En cultivos de condrocitos y macrófagos se ha descrito que son los extractos de polisacáridos contenidos en diversas variedades de nopal los responsables de la actividad inmunomoduladora (26, 27). Los efectos de nopal sobre la cicatrización de heridas se probaron en modelos animales, los cuales demostraron que tanto el uso de nopal

lío-filizado, como extractos orgánicos de nopal produjeron una reducción en el tiempo de cicatrización (28, 29).

El nopal también presenta efectos neuroprotectores. Se ha demostrado que el pre tratamiento con estos extractos polifenólicos de nopal atenúa considerablemente el daño neuronal producido por isquemia reperusión y estrés oxidante (25, 30, 31).

Los estudios anteriores apuntan a que los dos componentes potencialmente responsables de los efectos del nopal son los polisacáridos y los polifenoles, sin embargo aún se requieren más estudios en animales y humanos para sustentarlo.

Por otro lado las propiedades mencionadas anteriormente han originado un incremento en el interés e incluso hay en el mercado de suplementos alimenticios productos a base de extractos de nopal a los que se les atribuyen propiedades benéficas para la salud.

B. Obesidad

La obesidad a nivel mundial se considera como la epidemia creciente más importante de las últimas décadas (32). En México también es un grave problema de salud, ya que de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT 2012), el 71.2% de la población adulta mexicana presenta algún tipo de sobrepeso u obesidad. Esto impactará no sólo en términos de salud, por las múltiples anormalidades metabólicas asociadas a la obesidad, sino también en términos económicos, por la carga que representa a nivel mundial el tratamiento de estas enfermedades (33).

En términos clínicos la obesidad se puede definir como el exceso de acumulación de grasa o adiposidad en el cuerpo (34). Por razones prácticas el criterio para determinarla aunque podría considerarse simplista se basa en el peso corporal, específicamente se ha establecido el índice de masa corporal (IMC) como indicador. De manera general el IMC de sobrepeso es entre 25 – 30, y el de obesidad > 30 (35).

A pesar de años de investigación la etiología de la obesidad aún es un tema complejo. En estudios genéticos se ha tratado de explicar la presencia de obesidad a través de la identificación de mutaciones genéticas o polimorfismos y aunque se han encontrado resultados prometedores, estos explican sólo un porcentaje menor de la morbilidad de la obesidad y dejan fuera los factores ambientales, que son claramente un factor crucial en el desarrollo de obesidad (36).

La obesidad en términos sencillos es causada cuando la ingesta de nutrimentos excede el gasto energético. A pesar de que esto parece una ecuación simple, la obesidad va mucho más allá, pues múltiples factores pueden alterar este delicado balance. Los procesos de regulación de la

ingesta de alimento así como diversos factores que modifican el gasto metabólico, pueden contribuir al desbalance energético que da lugar a la obesidad.

B.1.0. Alteraciones metabólicas derivadas de la obesidad

La presencia de obesidad incrementa el riesgo y está asociada al desarrollo de aterosclerosis, resistencia a la insulina, esteatosis hepática, síndrome metabólico y diabetes tipo 2, entre otras enfermedades (37). Aunque aún no se conocen muchos de los mecanismos por lo cuales la obesidad deriva en estas enfermedades, se ha observado que la inflamación crónica de bajo grado que se presenta en la obesidad es en parte responsable del desarrollo de estas enfermedades.

B.2.0. Metainflamación

En la última década se han realizado esfuerzos para unificar los mecanismos detrás de la fisiopatología de la obesidad y de las anormalidades metabólicas derivadas de la misma. Esta búsqueda ha revelado una relación muy estrecha entre la ingesta excesiva de nutrientes y las anormalidades en los mediadores celulares y moleculares de la inmunidad e inflamación. De esta manera surge el término “metainflamación”, el cual se refiere a la inflamación crónica de bajo grado característica de la obesidad (38). Este término nace de diversos estudios tanto en modelos animales como humanos en donde observan que la presencia de obesidad está asociada a una expresión incrementada de los genes involucrados en la respuesta inflamatoria. A diferencia de la respuesta inflamatoria clásica producida por una infección, esta se incrementa lentamente y en el largo plazo no se resuelve. El primer insulto que dispara esta respuesta es la ingesta excesiva de nutrientes, y son justo las células responsables de almacenar este exceso de energía, tales como el adipocito, las que mantendrán la respuesta inflamatoria (32). Se ha demostrado que nutrientes específicos pueden activar al sistema inmune para producir inflamación, tal es el caso de dietas altas en grasa en donde se ha observado que tanto la administración de forma aguda, como crónica puede activar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), así como la estimulación del factor de transcripción NF- κ B, los cuales son clave en disparar la secreción de citocinas pro inflamatorias (39). Adicionalmente, se ha observado que esta inflamación se extiende a otros tejidos metabólicos, lo que contribuye a la disfunción metabólica. De esta manera es claro que la inflamación está en el camino entre la obesidad y enfermedad. Algunas de las características de esta metainflamación que contribuirán a la disfunción metabólica, son el incremento de citocinas

proinflamatorias, la disminución de los factores protectores (como la adiponectina) y la comunicación entre los procesos inflamatorios y las células metabólicas (38).

B.3.0 Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina está determinada por una reducción en la sensibilidad a la insulina en los principales órganos blanco (tejido adiposo, músculo, hígado etc.). La insulina es una hormona primordialmente anabólica que promueve el almacenamiento de energía en el estado postprandial. Algunas de sus funciones son estimular la captura de glucosa en músculo, inhibir la lipólisis de tejido adiposo e inhibir la gluconeogénesis en hígado, entre otras. De tal manera, si alguno de estos procesos se encuentra desregulado puede llevar a cambios profundos en la homeostasis de glucosa o bien a la acumulación de ácidos grasos en tejidos no grasos (40).

La obesidad, y mas específicamente la obesidad visceral, es un factor de riesgo importante para el desarrollo de resistencia a la insulina, este en el largo plazo junto con anomalías en la secreción de insulina, puede derivar en diabetes tipo 2. Un punto importante es como la obesidad puede contribuir al desarrollo de resistencia a la insulina en los diferentes tejidos. Esta asociación se ha investigado en modelos *in vitro* e *in vivo*, donde la delección de moléculas involucradas en la respuesta inflamatoria, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF α), el receptor de TNF α o la cinasa c-Jun N-terminal (JNK), mejora la sensibilidad a la insulina inducida por obesidad o dietas alta en grasa (41). Adicionalmente se ha observado que algunos mediadores de la respuesta inflamatoria tales como JNK o la cinasa de I κ B (IKK) pueden interferir en la cascada de señalización de insulina. Específicamente se ha observado que la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS) en residuos de serina por JNK o IKK puede inactivar a esta proteína evitando que la señal de insulina se traduzca dentro de la célula (42).

B.4.0. Esteatosis hepática

La esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) está definida como la acumulación de lípidos principalmente en forma de triglicéridos en individuos que no consumen cantidades significativas de alcohol y donde otras causas de esteatosis como toxinas o fármacos han sido excluidas (43). El término NAFLD describe un espectro de anomalías hepáticas, que de acuerdo a la teoría de las dos fases se clasifican de la siguiente manera: La primera fase constituye la deposición de triglicéridos en el hígado, y aunque en algunos casos esta podría considerarse como benigna, si la enfermedad progresa hacia la segunda fase, se desarrollan

infiltrados inflamatorios, estrés oxidativo, daño celular, y/o deposición de colágeno, dando lugar a la esteatohepatitis o incluso a la fibrosis y cirrosis (44).

La esteatosis hepática no alcohólica es la enfermedad hepática mas común en los países industrializados y en algunas casos se han referido a ella como la manifestación hepática del síndrome metabólico (45). La prevalencia de esta enfermedad aunque se estima entre 10-24% incrementándose a 25-75% en obesidad y diabetes tipo 2 (46) en términos reales se desconoce, debido a las dificultades para diagnosticarla. Algunos de los factores que contribuyen a esta problemática son la ausencia de síntomas, la poca sensibilidad de las enzimas hepáticas y la necesidad de una biopsia de hígado como el estándar de oro para diagnosticarla. La mayoría de los pacientes que se diagnostican por primera vez con NAFLD son asintomáticos, sólo algunos presentan fatiga y en algunos casos dolor en el cuadrante superior derecho abdominal, sin embargo en ausencia de cirrosis la hepatomegalia es el único hallazgo físico que se ha descrito en el 75% de los casos (47). En términos histológicos la esteatosis hepatocelular es el criterio distintivo para el diagnóstico de NAFLD; mas del 5% de hepatocitos con esta característica se considera NAFLD (48).

B.4.1. Fisiopatología de la esteatosis hepática

Aunque los mecanismos específicos para el desarrollo y progresión de la esteatosis hepática no alcohólica son bastante complejos y aún no han sido del todo clarificados, se entiende como una desregulación del metabolismo de lípidos en hígado, la cual se discutirá mas adelante (49). Sin embargo, es importante mencionar que esta desregulación está asociada a la presencia de obesidad, específicamente obesidad visceral, a la hiperinsulinemia y a la resistencia a la insulina (50). Adicionalmente en la segunda fase se observa una asociación entre el estrés oxidante, un desbalance en la secreción de adipocinas, la activación de inflamación por productos derivados de la microbiota y la evolución de NAFLD a esteatohepatitis.

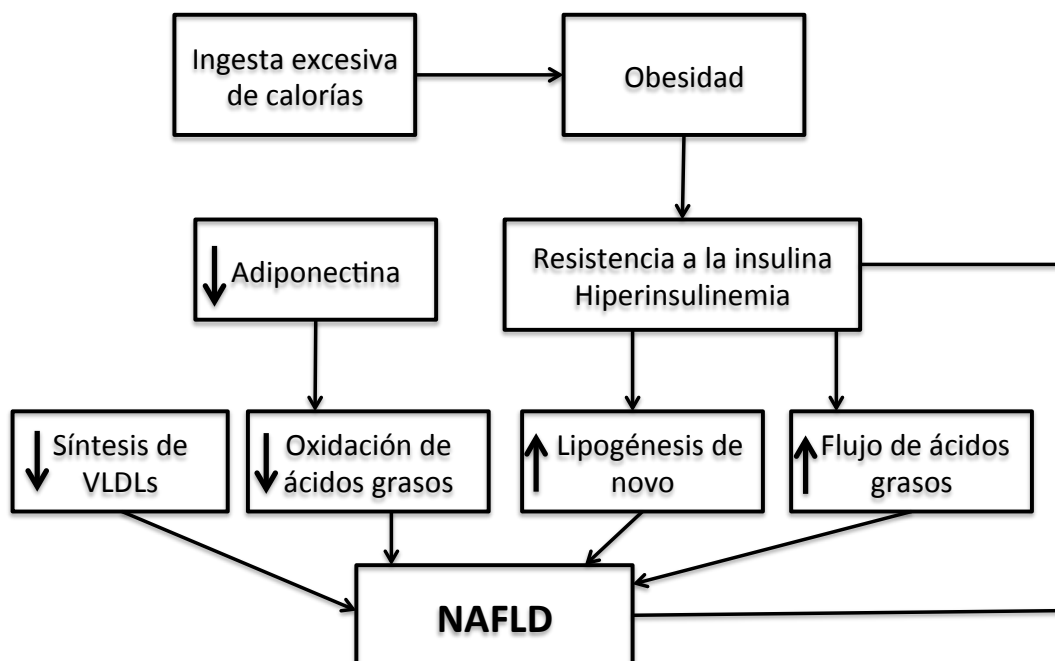


Figura 2. Diagrama de las posibles fuentes y mecanismos de la acumulación de lípidos en hígado. Adaptado de (50).

B.4.2. Resistencia a la insulina y esteatosis hepática

La esteatosis hepática está fuertemente asociada tanto con la resistencia hepática a la insulina como con la resistencia periférica (tejido adiposo y músculo). Aunque aún no es claro si la resistencia a la insulina es causa o consecuencia de la esteatosis hepática, en intervenciones para mejorar la resistencia a la insulina comúnmente se ha encontrado también una mejora en la esteatosis hepática (51).

Se ha observado que de manera general en estados de resistencia a la insulina hay una desregulación del flujo de ácidos grasos no esterificados, en donde la insulina es incapaz de suprimir la lipólisis del tejido adiposo (50). De esta manera, se ha sugerido que sobretodo en presencia de obesidad abdominal, los ácidos grasos no esterificados provenientes principalmente de la lipólisis del tejido adiposo y a través de la vena porta, contribuyen en su mayoría a la acumulación de triglicéridos en hígado. Aunado a esto el incremento en el flujo de ácidos grasos libres puede también inducir la resistencia hepática a la insulina a través de la translocación de la proteína cinasa C, delta (PKC- δ) hacia la membrana donde interfiere con la fosforilación de IRS para la adecuada señalización de insulina (52).

Una de las características de la resistencia a la insulina es la presencia de hiperinsulinemia. Se ha descrito que en ayuno, esta hiperinsulinemia puede elevar la lipogénesis de novo, lo cual

contribuirá a la acumulación de triglicéridos hepáticos (53). Otro de los efectos de la hiperinsulinemia es la inhibición de la proteína Foxa2 (por sus siglas en inglés forkhead box protein A2), cuyo papel es promover la oxidación de ácidos grasos en ayuno y en postprandio es inhibida por la cascada de señalización de insulina. Se ha reportado que aun en estados de resistencia a la insulina Foxa2 permanece sensible a sus acciones, por lo que incluso en ayuno podría estar inactiva, esto puede producir una disminución en la oxidación de ácidos grasos contribuyendo a la acumulación de triglicéridos en hígado (50).

B.4.3. Adipocinas

Se considera que la esteatosis hepática puede afectar hasta al 75% de población obesa. Es claro que la obesidad es un factor de riesgo importante para el desarrollo y evolución de la esteatosis hepática no alcohólica. Uno de los factores primarios que relaciona la obesidad, la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática es la expresión y secreción anormal de las adipocinas (54). Las adipocinas son proteínas secretadas significativamente aunque no exclusivamente por el tejido adiposo (55). Aunque la expresión de las adipocinas varía en función del compartimento de tejido adiposo, de manera general y con excepción de la adiponectina, los niveles de adipocinas en suero se incrementan proporcionalmente a la cantidad de tejido adiposo. Por lo tanto en estados de obesidad la expresión de estas adipocinas se encuentra incrementada (56). Las adipocinas tienen una amplia gama de funciones que van desde la regulación de la ingesta de alimento hasta la inducción de inflamación. De manera general se han clasificado como proinflamatorias o antiinflamatorias. Algunas de las adipocinas proinflamatorias son la resistina, el TNF α y la interleucina 6 (IL-6), mientras que la adiponectina se considera una adipocina antiinflamatoria que presenta efectos metabólicos benéficos. Las observaciones anteriores han llevado a la conclusión de que la disfunción metabólica asociada a la obesidad es resultado de un desbalance entre la secreción de las citocinas pro y antiinflamatorias (56). De hecho existe una fuerte asociación entre bajos niveles de adiponectina y la presencia de anomalías metabólicas tales como diabetes tipo 2 y esteatosis hepática no alcohólica (57, 58).

La adiponectina además de ser una adipocina antiinflamatoria tiene efectos hepatoprotectores, promueve la oxidación de ácidos grasos tanto en hígado como en músculo, mejora la señalización de la insulina e inhibe la gluconeogénesis hepática (55). La secreción de adiponectina está regulada por diversos factores. Se ha demostrado que algunas citocinas proinflamatorias tales como TNF α e IL-6 inhiben la secreción de esta hormona mientras que la

disminución de peso y la activación del receptor activador de la proliferación de peroxisomas gama (PPAR γ) induce adipogénesis que resulta en la inducción de la adiponectina (58).

Considerando las funciones de la adiponectina y la relación negativa con estados de obesidad, diversos estudios investigaron el efecto del incremento o la administración de la adiponectina sobre el desarrollo de NAFLD. Los resultados fueron claros pues al incrementar tanto valores de adiponectina como la expresión del receptor se atenuó tanto el desarrollo como la evolución de NAFLD (59).

B.4.4. Estrés oxidante

Como se mencionó anteriormente uno de los factores que disparan la transición de la esteatosis hepática no alcohólica hacia esteatohepatitis es la presencia de estrés oxidante (60). En otros estudios, se ha encontrado que la severidad de la esteatohepatitis correlaciona con el grado de estrés oxidante (57).

El estrés oxidante es el resultado de un desbalance entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, que pueden dar como resultado un daño oxidante en las macromoléculas celulares, tales como peroxidación lipídica y daño al ADN, entre otros.

En esteatosis hepática no alcohólica, la principal fuente de ERO proviene de la oxidación de ácidos grasos. Se ha observado que comúnmente los pacientes con NAFLD tienen disfunción mitocondrial (57). Esta disfunción promueve la transferencia de electrones en la cadena respiratoria hacia oxígeno molecular produciendo ERO tales como anión superóxido o peróxido de hidrógeno. Las ERO pueden promover a su vez mayor disfunción mitocondrial (por peroxidación lipídica de membranas mitocondriales) o bien inducir la producción y secreción de citocinas proinflamatorias. Esta inducción a su vez activará las células estelares en hígado perpetuando así la respuesta inflamatoria y promoviendo la evolución de la enfermedad (60).

Adicionalmente la disfunción mitocondrial promoverá la activación de otras vías de oxidación de ácidos grasos tales como la oxidación peroxisomal o microsomal. Estas dos vías al ser fuentes naturales de ERO contribuirán al desbalance y por lo tanto al estrés oxidante (60).

Otra de las contribuciones del estrés oxidante al desarrollo de esteatosis hepática es a través de la degradación de la proteína Apo B. Pan y colaboradores demostraron que la peroxidación lipídica induce la proteólisis de la proteína Apo B en hígado, inhibiendo así la producción de VLDL (61). Esto evita que los triglicéridos se exporten del hígado, posiblemente contribuyendo al desarrollo de esteatosis hepática.

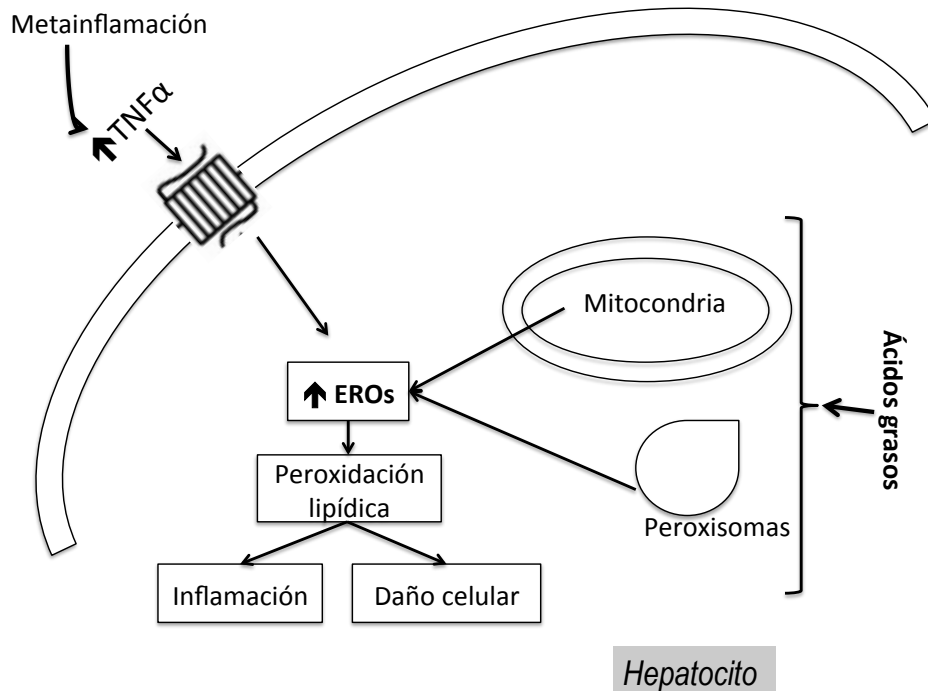


Figura 3. Mecanismos por lo cuales la acumulación de lípidos en hígado, la inflamación, y la especies reactivas de oxígeno contribuyen al daño hepático en esteatosis hepática no alcohólica.

B.4.5. Metabolismo de lípidos y esteatosis hepática

Desde un punto de vista cinético, la acumulación de lípidos hepáticos responde a un desbalance entre la disponibilidad de lípidos y la disposición de los mismos (62). Las fuentes de ácidos grasos que pueden potencialmente contribuir a la acumulación de lípidos en hígado son: 1) captura de ácidos grasos no esterificados, provenientes principalmente del tejido adiposo, 2) ácidos grasos de la lipogénesis de novo y 3) ácidos grasos provenientes de la dieta, que a través de los remanentes de quilomicrones pueden ser capturados por el hígado.

Por otro lado los mecanismos de disposición de ácidos grasos son principalmente oxidación para generación de ATP e incorporación a las partículas ricas en triglicéridos (VLDL) para su secreción (60). La regulación del metabolismo de lípidos en los diferentes estados fisiológicos (ayuno y postprandio) y en enfermedades, en comparación con la salud es clave para entender la etiología de la esteatosis hepática. Anormalidades en cualquiera de los mecanismos de regulación podrían llevar a la acumulación anormal de triglicéridos en hígado.

Se ha descrito que la acumulación de triglicéridos en el hígado proviene principalmente de los ácidos grasos libres presentes en la circulación. Otras fuentes contribuyen también en menor

proporción; como son los provenientes de la síntesis de novo en hígado y por último los provenientes de la dieta (53, 62).

En estados de obesidad y resistencia a la insulina hay un incremento en el flujo de ácidos grasos provenientes de la lipólisis de tejido adiposo. La translocación de los ácidos grasos al interior del hepatocito es principalmente a través de los siguientes transportadores; caveolinas, proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP), translocasas de ácidos grasos (FAT/CD36) y proteínas de unión a ácidos grasos (FABP). Diversas observaciones apuntan a que la desregulación de estos transportadores puede contribuir a la acumulación de triglicéridos en hígado. En pacientes con NAFLD se observó que la expresión génica de CD36 estaba incrementada (63). Paralelamente en animales alimentados con una dieta alta en grasa se encontró una correlación entre el incremento en la expresión de CD36 en hígado y el acúmulo de lípidos en hígado (64).

La síntesis de novo es estimulada en el estado postprandial por insulina a través de la activación del factor de transcripción SREBP1c. Este a su vez estimulará a las enzimas lipogénicas acetil CoA carboxilasa (ACC), la sintasa de ácidos grasos (FAS) y la esteroil-CoA desaturasa (SCD1). El producto de la enzima ACC, el malonil-CoA, actúa como un regulador clave en el destino de los ácidos grasos (esterificación u oxidación). Un aumento en la cantidad de malonil-CoA refleja un síntesis de novo activa, estimulando que los ácidos grasos se esterifiquen en vez de oxidarse. De manera inversa, bajos niveles de malonil-CoA estimularán la actividad de la carnitina palmítil transferasa 1 (CPT1), la enzima que canaliza a los ácidos grasos hacia la oxidación en la mitocondria (β -oxidación) (46). La contribución de la síntesis de novo en esteatosis hepática se ha observado en ratones *ob/ob* en donde la deficiencia de SREBP1c, los protege del desarrollo de esteatosis y resistencia hepática a la insulina (65). Adicionalmente en sujetos con esteatosis hepática se ha observado que la síntesis de novo de ácidos grasos en ayuno está incrementada (posiblemente asociado a la hiperinsulinemia) en comparación con sujetos sanos, sin embargo ésta no se incrementa en el estado postprandial (62).

Por otro lado, algunos reportes sugieren que defectos en la oxidación de ácidos grasos pueden contribuir a la acumulación de triglicéridos en hígado. Los ácidos grasos en hígado son metabolizados principalmente a través de la beta oxidación que ocurre en la mitocondria y en menor proporción en los peroxisomas. Las vías oxidativas extra mitocondriales son relevantes en situaciones donde la disponibilidad de ácidos grasos está incrementada, tal como es la esteatosis hepática. El producto de la beta oxidación, acetil Co-A, se condensará para la

formación de cuerpos cetónicos o bien continuará hacia el ciclo de Krebs para su conversión a CO₂ (62).

La esteatohepatitis se ha asociado comúnmente a la disfunción mitocondrial derivada del exceso de ácidos grasos, los factores proinflamatorios y la peroxidación lipídica. Esta disfunción además disminuirá la capacidad antioxidante de la célula, producirá ERO que, como se mencionó anteriormente, pueden contribuir a la evolución de la esteatosis hepática (46).

Una de las funciones de la insulina es suprimir la secreción de VLDLs en el postprandio. En el síndrome metabólico la presencia de hipertrigliceridemia se asocia a la resistencia a la insulina, ya que la insulina se vuelve incapaz de suprimir la secreción de VLDLs (46). Por el contrario en esteatosis hepática, aunque el flujo de ácidos grasos hacia el hígado es alto, aparentemente se disminuye la secreción de VLDLs. Las causas de esta disminución pueden tener múltiples orígenes. Las VLDLs son partículas ricas en triglicéridos que son sintetizadas en el hígado. Las funciones de estas partículas son entregar energía en forma de lípidos a los tejidos periféricos (músculo, tejido adiposo) y esta redistribución de energía a su vez protegerá al hígado de una excesiva acumulación de triglicéridos lo cual podría inducir lipotoxicidad (66). El ensamblaje y secreción de las VLDLs se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y requiere principalmente de dos componentes; la apolipoproteína B (ApoB) y la enzima responsable de la transferencia de triglicéridos (MTTP). Anormalidades en la regulación de cualquiera de estas dos proteínas puede dar como resultado un formación defectuosa de VLDLs, la cuales no serán secretadas y por el contrario pueden ser degradadas contribuyendo nuevamente al incremento de triglicéridos en hígado (67).

La excesiva degradación de la ApoB es una de las anormalidades por las cuales puede haber una deficiencia en la secreción de VLDL. La obesidad ha sido asociada a la presencia del estrés de retículo endoplásmico en hígado (68) y esta patología evita el plegamiento de la apoB (66) en el retículo endoplásmico evitando la formación de VLDLs. La degradación de la ApoB también se ha visto inducida en estrés oxidante por productos de peroxidación lipídica (61) y en situaciones de deficiencias de la enzima que transfiere fosfolípidos a las VLDLs (PLTP) mediante un mecanismo dependiente de ERO que destruyen las recién sintetizadas ApoB (69). Como se mencionó anteriormente la MTTP tiene un papel crucial en el ensamblaje de las VLDLs, de tal manera, se ha reportado que la disminución en la expresión de esta enzima puede disminuir la formación de VLDL contribuyendo a la acumulación de triglicéridos en hígado (70).

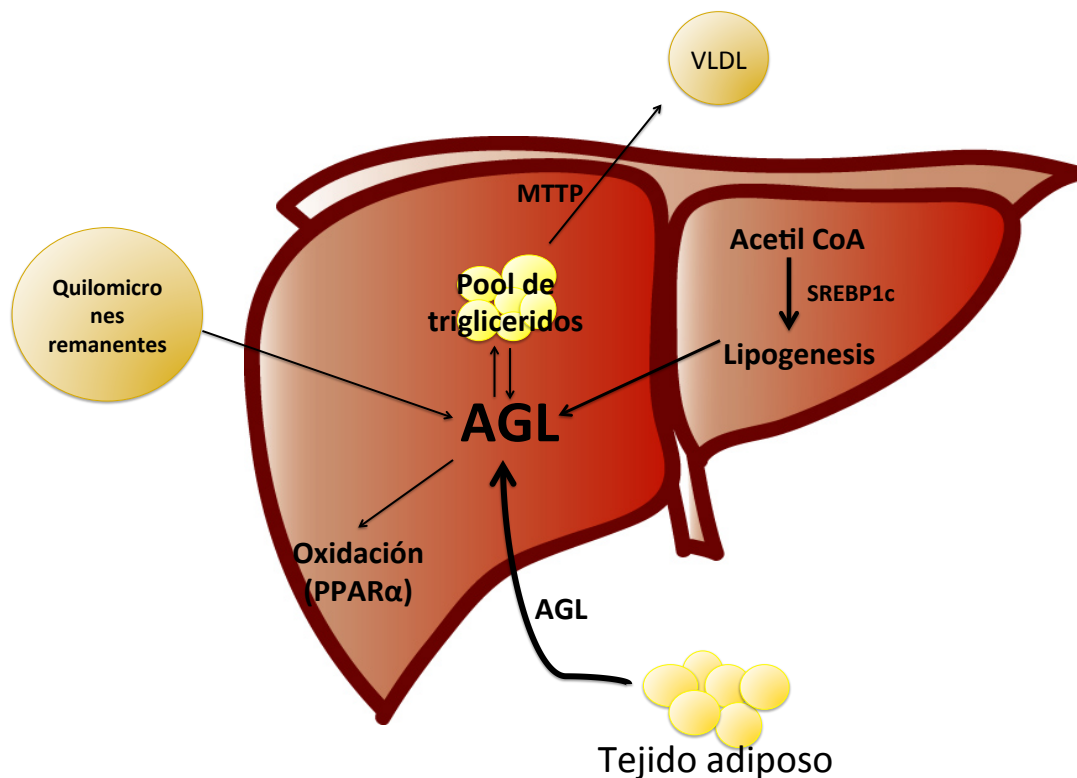


Figura 4. El desequilibrio entre la captura, síntesis, oxidación y exportación de ácidos grasos en hígado puede llevar al desarrollo de esteatosis hepática.

B.4.6. Nutrición y esteatosis hepática

La ingesta excesiva de nutrientes y la falta de actividad física se han asociado al desarrollo de obesidad y esteatosis hepática. La composición de los macronutrientes también ha demostrado tener un efecto. De manera general las dietas altas en grasa, especialmente grasa saturada y colesterol promoverán la activación de la respuesta inflamatoria, contribuyendo a la metainflamación observada en obesidad y NAFLD (65). Adicionalmente ingestas elevadas de refrescos o jarabes fructosados, carne y un bajo consumo de alimentos ricos en ácidos grasos omega 3 también ha sido asociada con la presencia de NAFLD (71).

Debido a la falta de estudios precisos en la actualidad no se ha aprobado ningún fármaco para el tratamiento de NAFLD. De esta manera los tratamientos se basan en cambios en el estilo de vida como pueden ser la pérdida de peso, el ejercicio y las intervenciones nutricionales (72).

La búsqueda de componentes dietarios que puedan ayudar a prevenir o tratar la esteatosis hepática no alcohólica se ha incrementado de manera considerable en los últimos años. En cuanto a los macronutrientes se ha encontrado que incrementar el consumo de ácidos grasos poliinsaturados, omega 3 atenúa la evolución de la esteatosis hepática en humanos (73). Tovar

y colaboradores, por su parte, observaron que el consumo de proteína de soya en comparación con caseína atenuaba la acumulación de lípidos en hígado y por lo tanto la lipotoxicidad en un modelo animal de obesidad (74).

Otros estudios en modelos animales han observado una mejora en la esteatosis hepática y su evolución con el consumo de extractos de té verde, β -conglucina y betaína (75-77).

En algunos estudios con suplementación de vitamina E en humanos, se han demostrado mejoras en algunos de los marcadores de NAFLD, sin embargo los resultados aún no son concluyentes (72).

Algunos estudios enfocados al efecto hipocolesterolémico de diferentes tipos y fuentes de fibra soluble han observado que paralelamente al efecto hipocolesterolémico existe una disminución en el contenido de lípidos en hígado (78, 79) sin embargo la relevancia de este efecto en el desarrollo de esteatosis hepática aún no se ha evaluado.

B.5.0. Obesidad, esteatosis hepática y fisiología intestinal

La metainflamación, observada en obesidad, se ha asociado comúnmente a factores proinflamatorios secretados del tejido adiposo visceral principalmente. El mecanismo exacto de esta inflamación aún no se ha elucidado completamente, sin embargo, se cree que proviene de la acumulación de macrófagos proinflamatorios en el tejido adiposo hipertrofiado (80). Recientemente se ha sugerido que el intestino es una conexión entre la ingesta excesiva de nutrientes, el desarrollo de obesidad, la metainflamación y las anormalidades derivadas de la misma (81, 82).

Estos estudios nacen de observaciones en donde el análisis de la microbiota intestinal revela una diferencia entre sujetos obesos y sanos (83). Por otra parte, se demostró que la administración de un prebiótico mejora significativamente los marcadores de inflamación sistémica y atenúa la esteatosis hepática en modelos de obesidad a través de un mecanismo que involucra tanto un cambio en la microbiota como en la secreción de la hormona gastrointestinal GLP-2 (84).

El sistema gastrointestinal es la primera línea de contacto del cuerpo con el alimento. Este no solo está compuesto por células de absorción que adquieren los nutrientes, sino que es considerado como el órgano endocrino e inmune más grande del cuerpo. De esta manera es claro que alteraciones intestinales pueden resultar en perturbaciones profundas al sistema endocrino e inmunológico.

B.5.1. Inflamación intestinal y obesidad

En estudios recientes en ratones se ha demostrado que la administración de dietas altas en grasa inducen la expresión de algunas citocinas proinflamatorias en el intestino delgado y el colon (85, 86). De manera interesante, esta expresión correlaciona significativamente con la ganancia de peso y la elevación en los valores de glucosa e insulina. En otros estudios en humanos obesos, también se ha demostrado una asociación positiva entre marcadores de inflamación intestinal y la intolerancia a la glucosa (82). Li y colaboradores demostraron que tanto la inflamación intestinal inducida por dietas altas en grasa como por dextran sulfato de sodio (DSS), como modelo de colitis, estaba asociada a inflamación en el tejido adiposo mesentérico (87). Finalmente Lam y colaboradores demostraron, en un modelo animal, que el consumo de una dieta alta en grasa modificaba la permeabilidad intestinal, la microbiota e inducía inflamación tanto en colon como en el tejido adiposo visceral. Un punto interesante fue que los cambios en la microflora correlacionaron significativamente con la permeabilidad intestinal y la ganancia de peso (88).

Aunque aún faltan estudios, las observaciones anteriores sugieren que la inflamación intestinal precede al desarrollo de obesidad y a las anormalidades derivadas de la misma. Los mecanismos aún no han sido del todo elucidados; sin embargo, se ha sugerido que la permeabilidad intestinal y la microflora juegan un papel importante (81).

B.5.2. Permeabilidad intestinal

Como mencionamos anteriormente el intestino no solo es un lugar de absorción, sino también es interfaz entre el huésped y el ambiente que sensorá la presencia de nutrientes, toxinas y patógenos. La integridad de la barrera intestinal es esencial para evitar el paso de productos no deseados desde el lumen intestinal hacia la lámina propia. La barrera intestinal está compuesta por una capa de mucosa y el epitelio intestinal; una capa sencilla de células intestinales unidas por uniones estrechas y uniones adherentes. La ruptura de estas uniones, puede aumentar la permeabilidad intestinal y hacer que se pierda la funcionalidad del epitelio intestinal. De hecho se ha asociado a diversas enfermedades como síndrome del colon irritable, diabetes tipo 1 y obesidad (89).

Los lipopolisacáridos son componentes derivados de las bacterias gram negativas que son capaces de activar una respuesta inmune a través de la unión al receptor TLR4 (90). Esta unión inducirá la expresión de citocinas proinflamatorias comúnmente observadas en la metainflamación.

Hace algunos años Cani y colaboradores mostraron que la administración de dietas altas en grasa inducía cambios en la microbiota intestinal, la ganancia de peso y adiposidad así como en otros síntomas del síndrome metabólico. Paralelamente se observó un incremento en los niveles plasmáticos de lipopolisacáridos (LPS) (91). Este hallazgo junto con observaciones en donde la infusión crónica de LPS inducía resistencia a la insulina, y la delección de CD14 (molécula adaptadora de TLR4 en el reconocimiento de LPS) evitaba los cambios metabólicos inducidos por una dieta alta en grasa, los llevó a acuñar el término de endotoxemia metabólica. Este término describe al proceso inflamatorio de bajo grado derivado de los niveles circulantes de LPS, que difiere de la endotoxemia inducida por sepsis.

La endotoxemia metabólica no solo está asociada con obesidad si no también con la patogénesis de NAFLD, ya que se ha encontrado en pacientes con NAFLD una elevación en los niveles de endotoxinas en plasma y la expresión de TLR4 (92).

Los mecanismos por los cuales los niveles de LPS en plasma se encuentran incrementados aún se desconocen. Diversos estudios han sugerido que se deben a modificaciones en la integridad de la barrera intestinal. Algunos autores han demostrado tanto en modelos genéticos de obesidad, como inducidos con dietas altas en grasa que hay una modificación en el epitelio intestinal en donde las uniones estrechas entre los enterocitos se degradan dando lugar a un incremento en la permeabilidad intestinal y paralelamente se observa un incremento en los niveles de LPS. Lo anterior sugiere que modificaciones en la permeabilidad intestinal pueden dejar pasar los LPS e iniciar el proceso de endotoxemia metabólica (84, 85).

Otros autores han observado que al bloquear la secreción de quilomicrones del intestino se disminuyen los niveles de endotoxinas por lo que proponen que la absorción de LPS es a través de la formación de quilomicrones a nivel intestinal (93).

B.5.3. Nutrición y fisiología intestinal

En investigaciones recientes se ha demostrado que la dieta afecta profundamente tanto la microbiota como la fisiología intestinal (94). Debido a la asociación entre la fisiología intestinal y el desarrollo de obesidad y sus anormalidades metabólicas, en diversos estudios se han realizado intervenciones dietarias con el fin de modular la microbiota, la permeabilidad y la inflamación intestinal y de esta manera prevenir las anormalidades derivadas de la ingesta de una dieta alta en grasa.

Diversas intervenciones dietarias en modelos animales han utilizado polisacáridos fermentables tales como arabinosilanos, fructo-oligosacáridos y otros compuestos para mejorar las anormalidades metabólicas asociadas al consumo de una dieta alta en grasa (84, 95-97). En

muchos casos esta mejora correlaciona con cambios en la microbiota intestinal y en parámetros de inflamación intestinal. Aunque aún se desconocen los mecanismos específicos, estos efectos se han asociado a cambios en los productos derivados de la fermentación por la microbiota (ácidos grasos de cadena corta) y a la estimulación diferencial de las células enteroendocrinas entre otros.

C. Modelo animal de obesidad; Rata Zucker (*fa/fa*)

Las ratas Zucker obesas son el modelo animal más utilizado y mejor conocido de obesidad genética. Se ha descrito que hacia la semana 14, aproximadamente el 40% de su peso corporal son lípidos. Estos animales, además, presentan alteraciones semejantes a las que aparecen en el síndrome metabólico humano (98). Las ratas Zucker (*fa/fa*) obesas presentan una mutación en el gen del receptor de leptina, lo que produce una sustitución de glutamina por prolina en el residuo 269 de la proteína (99). Esta mutación resulta en hiperfagia, obesidad, resistencia a la insulina, hipercolesterolemia y resistencia a la leptina, entre otras anormalidades (100). Se ha descrito también que este modelo desarrolla esteatosis hepática a partir de las 8 semanas de edad (101). La presencia de esteatosis hepática se ha asociado a una sobreexpresión de la sintasa de ácidos grasos (FAS) y del transportador CD36, así como a un incremento en la actividad de la ACC (102). Otros autores han sugerido defectos en la función mitocondrial (ciclo de Krebs, beta oxidación, fosforilación oxidativa y defensas antioxidantes) en los hígados de las ratas Zucker obesas como resultado de un metabolismo anormal de la metionina (101).

Adicionalmente se ha postulado que la rata Zucker obesa sobreexpresa TNF α lo cual puede inducir la activación de la NADPH oxidasa, y por ello en estos animales se produce más cantidad de anión superóxido posiblemente contribuyendo al estrés oxidante (98).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La creciente epidemia de obesidad y síndrome metabólico son en la actualidad un grave problema de salud pública en México (50).

Actualmente no existe ningún tratamiento farmacológico para la esteatosis hepática y son la disminución de peso y la actividad física las únicas estrategias viables por el momento en donde de manera general el apego del paciente es bastante bajo (72). Por lo tanto es importante establecer o identificar elementos o componentes de la dieta que puedan contribuir al tratamiento o prevención de esta anormalidad.

El nopal es un producto nativo de México, económico y altamente disponible, que se ha utilizado por muchos años en la medicina tradicional para el tratamiento de diabetes entre otras enfermedades. En diversos estudios, se ha observado que el nopal posee un efecto antihiper glucémico e hipocolesterolémico en humanos y modelos animales (18, 23). Aunque en los últimos años las investigaciones en torno a los efectos del consumo de nopal o de extractos de nopal sobre la fisiología han crecido considerablemente, el efecto del consumo de nopal en estados de obesidad y anormalidades derivadas de la misma, como esteatosis hepática aún no se ha evaluado.

De esta manera, el propósito de la presente investigación fue evaluar el efecto del consumo de nopal en un modelo animal de obesidad, específicamente sobre el desarrollo de esteatosis hepática. Esto con el objetivo de establecer una línea de investigación hacia efectos potenciales en humanos que puedan contribuir a la prevención de estas enfermedades.

Adicionalmente y considerando tanto el papel del intestino, como del tejido adiposo sobre el desarrollo de esteatosis hepática se realizó un estudio adicional para conocer los efectos del consumo de nopal sobre el desarrollo de adiposidad y la fisiología intestinal en un modelo animal inducido a obesidad por la alimentación con una dieta alta en grasa.

RELEVANCIA E IMPACTO

La obesidad es un grave problema de salud en México. El desarrollo de anomalías metabólicas derivadas de la obesidad tales como resistencia a la insulina, diabetes y esteatosis hepática entre otras, trae consigo consecuencias económicas significativas (103). De esta manera la prevención o tratamiento de estas anomalías es crucial.

Considerando que no existe actualmente ningún tratamiento farmacológico contra el desarrollo de esta enfermedad, es de vital importancia elaborar estrategias dietarias que puedan ayudar a la prevención y tratamiento de estas enfermedades. Dado que el nopal se usa desde hace muchos años de manera empírica en la medicina tradicional, la evaluación de los efectos del consumo de nopal en modelos de obesidad nos ayudará a determinar los efectos reales del consumo de este alimento y establecer las bases científicas para su uso.

HIPÓTESIS

El consumo crónico de nopal en un modelo de obesidad y esteatosis hepática disminuirá la acumulación de lípidos en hígado, provocando una mejora en el metabolismo del mismo.

OBJETIVOS

General

Determinar el efecto del consumo crónico de nopal deshidratado sobre el desarrollo de la esteatosis hepática en un modelo de obesidad, rata Zucker (*fa/fa*) obesa.

Específicos

1. Estudiar el efecto del consumo de nopal en un modelo de rata obesa Zucker (*fa/fa*) sobre:

- Los parámetros bioquímicos en suero; glucosa, insulina, glucagon, ácidos grasos libres, colesterol, triglicéridos, adiponectina.
- La cascada de señalización de insulina en el hígado.
- La histomorfología del hígado.
- El contenido de lípidos en hígado (triglicéridos y colesterol).
- La síntesis y oxidación de ácidos grasos en hígado: expresión génica y de proteína de enzimas involucradas en lipogénesis y oxidación de lípidos.
- La captura y secreción de lípidos en hígado: expresión génica de transportadores de ácidos grasos y expresión génica y de proteína de enzimas involucradas en la síntesis de lipoproteínas.
- Funcionalidad hepática.
- El perfil de lipoproteínas en suero.

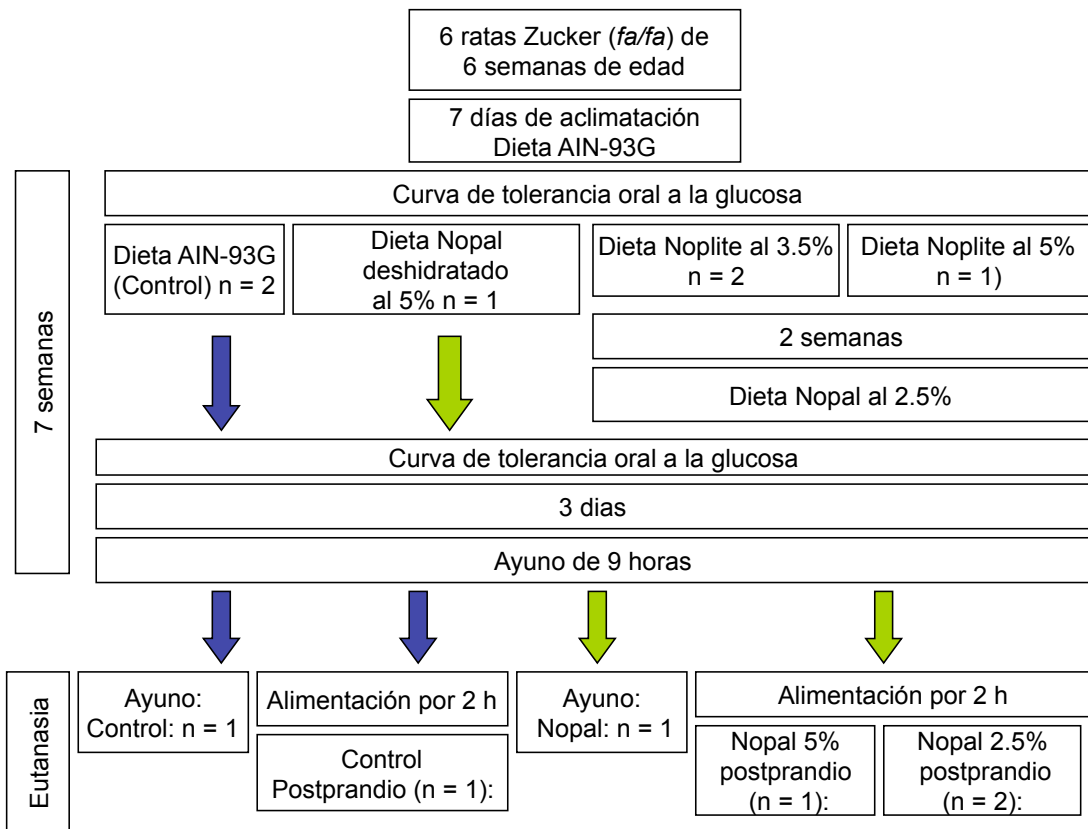
2. Estudiar el efecto del consumo de nopal sobre la fisiología intestinal y la adiposidad en ratas Sprague-Dawley alimentadas con un dieta alta en grasa como modelo de obesidad.

DISEÑO EXPERIMENTAL

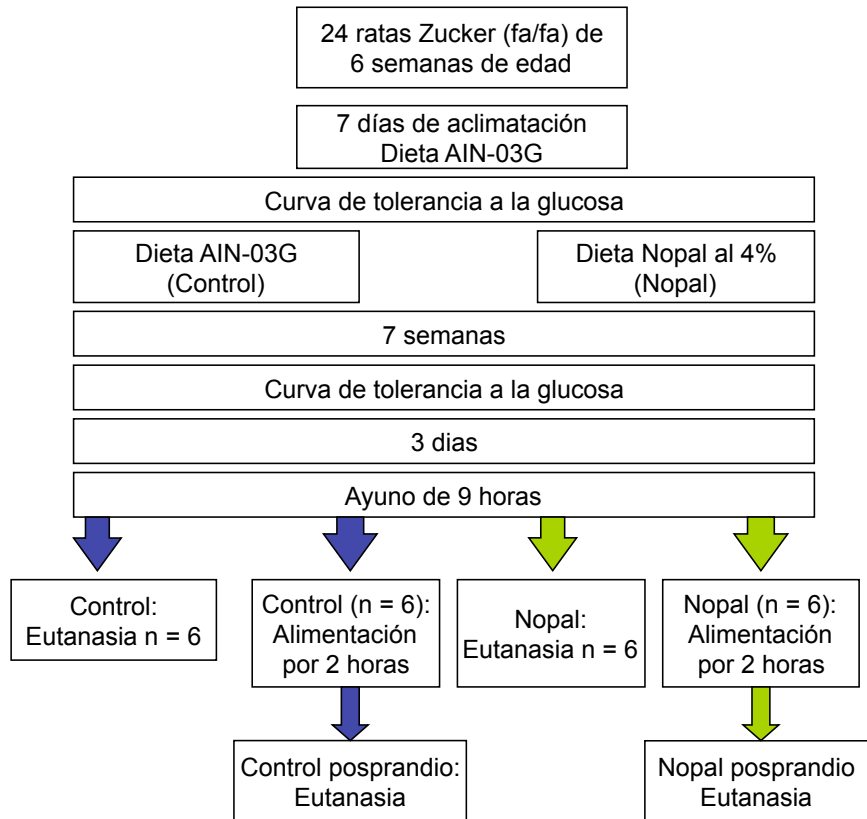
A lo largo del presente trabajo se realizaron 4 estudios; los tres primeros en el modelo genético de obesidad, la rata Zucker (*fa/fa*) y el último en ratas Sprague-Dawley inducidas a obesidad por dieta. A continuación se muestra el diagrama del diseño experimental de cada uno de estos estudios.

1) Estudio piloto: Estandarización del modelo

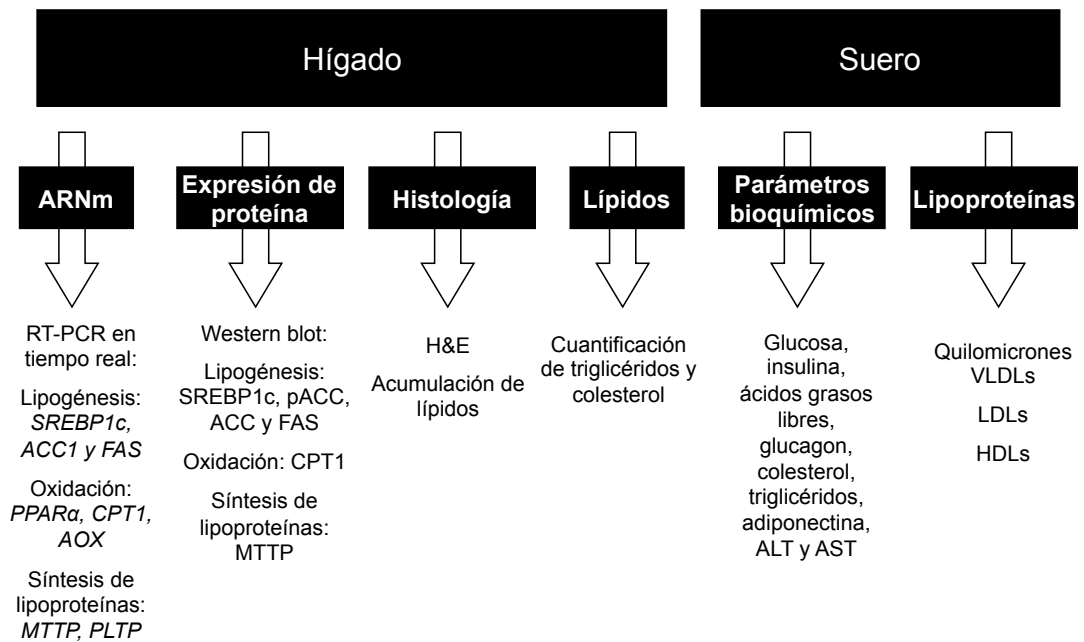
El estudio piloto se realizó con el objetivo de determinar la mejor fuente de nopal deshidratado así como la concentración adecuada.



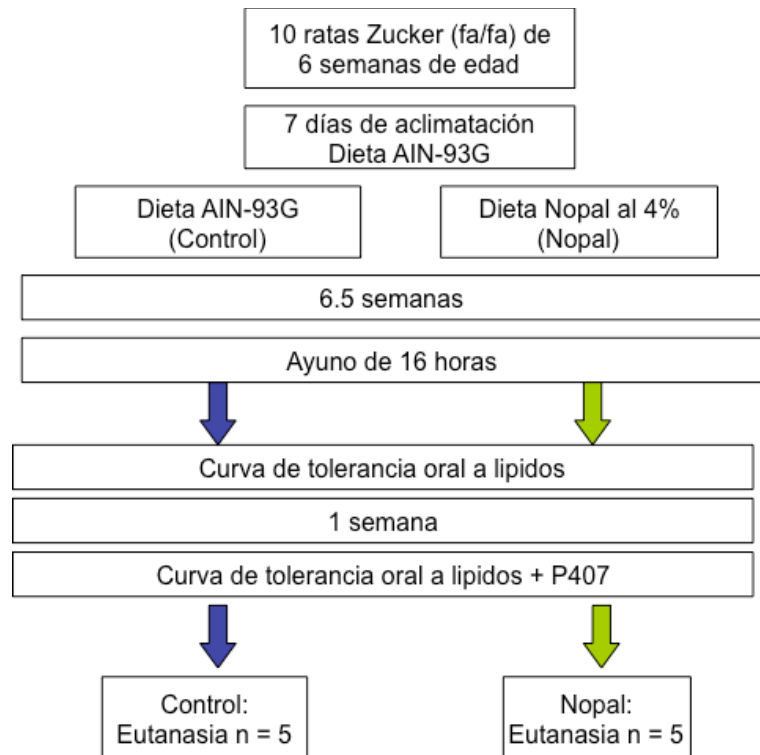
2) Efecto del consumo de nopal sobre el desarrollo de esteatosis hepática en ratas Zucker (*fa/fa*): Estudio crónico 1.



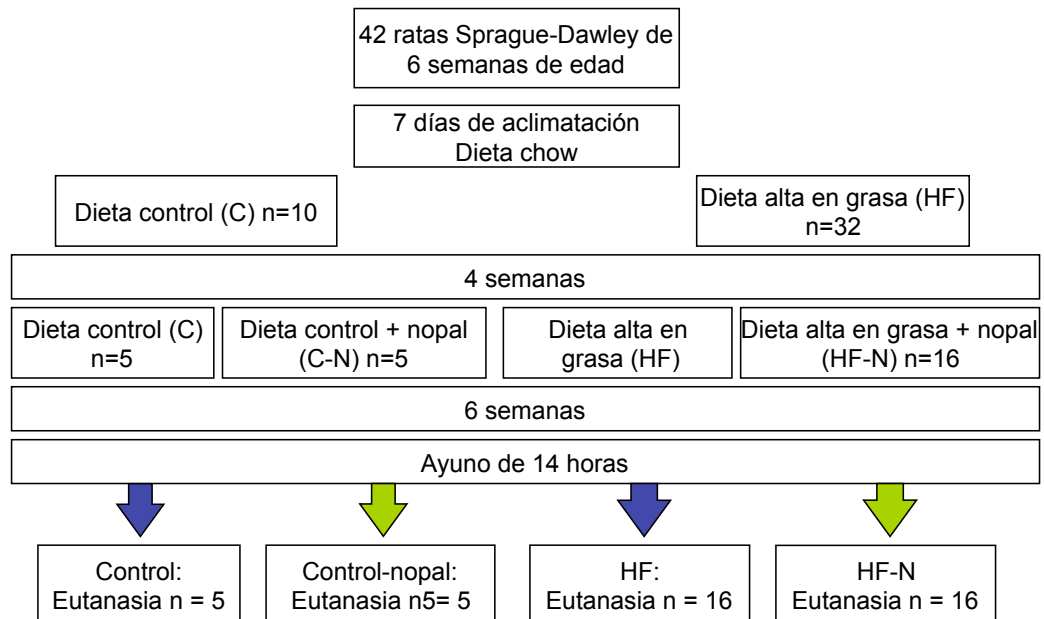
2.2) Determinaciones en hígado y suero de los animales experimentales



2.3 Efecto del consumo de nopal sobre la absorción de lípidos a nivel intestinal en ratas Zucker (fa/fa): Estudio crónico 2.



3. Efecto del consumo de nopal sobre el desarrollo de adiposidad y la fisiología gastrointestinal en ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa. Estudio crónico 3.



METODOLOGÍA

A. Caracterización del nopal

A.1. Preparaciones de nopal

En los estudios in vivo, se utilizaron dos preparaciones de nopal: nopal deshidratado por calor, y una forma comercial de nopal seco Noplite® (Nutriva, México).

El nopal (*Opuntia ficus indica*) utilizado para la deshidratación por calor fue un nopal mediano (aproximadamente 80 g) amablemente donado por el Dr. Esteban Olvera, productor de Milpa Alta. Este nopal se recolectó y desespínó el mismo día, se lavó con solución de hipoclorito de sodio al 0.1% y se cortó en rebanadas de 1-2 cm de grosor para ser secado en un secador de charolas a 50°C por 24 a 36 h. Una vez seco, el nopal fue molido y tamizado por una malla 20 para homogeneizar el tamaño de partícula.

A.2. Determinación del nopal

Para la caracterización de la variedad de *Opuntia* (nopal), se recolectó una muestra del cladodio, la flor y el fruto de la planta de la región de Milpa alta en el Distrito Federal, de donde se obtuvieron las muestras para el proceso de secado y posterior elaboración de las dietas. La caracterización se realizó en el Instituto de Ecología de la UNAM, por el M en C. Carlos Gómez Hinostrosa, la muestra permanece como registro en el herbario bajo el No. 1304623. La fotografía del ejemplar se encuentra en el anexo IV.

A.3. Análisis químico

El análisis químico del nopal deshidratado se realizó en el departamento de Ciencia y Tecnología de alimentos del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, de acuerdo con los métodos establecidos por la AOAC y se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Composición química del nopal deshidratado por calor.

Análisis proximal (%)	
Humedad	3.60
Cenizas	14.12
Proteína	20.15
Extracto etereo	ND
Fibra insoluble	33.22
Fibra soluble	5.85
Carbohidratos	23.06

A.4. Extracción de polifenoles

La identificación de polifenoles de nopal se realizó a partir de un extracto. Brevemente 10 g de nopal deshidratado se homogeneizaron en 50 mL de metanol/agua (50:50) durante 1 h con agitación constante. El homogenado se filtró con un filtro Whatman No. 100. El residuo obtenido se homogenizó con 50 mL de acetona/agua (70:30) durante 1 h con agitación constante y se filtró nuevamente. El residuo se homogenizó con 50 mL de agua destilada durante 15 min con agitación constante y se filtró nuevamente. Los filtrados obtenidos en los tres pasos se juntaron y se sometieron a hidrólisis ácida con HCl concentrado durante 3 h. Se evaporaron a sequedad 10 mL del extracto (a temperatura ambiente) y se resuspendió en 1 mL de etanol. Previo la inyección el extracto se paso por un filtro de 0.22 μm

A.5. Identificación de polifenoles presentes en el nopal deshidratado

La identificación de los polifenoles de nopal se realizó por medio de HPLC y un cromatograma representativo se muestra en la Figura 5. Brevemente el análisis por HPLC se realizó con un equipo Waters, acoplado a un detector de arreglo de diodos. La columna es una C18 (3.9 x 150 mm. 5 μm de tamaño de partícula). La fase móvil A consiste en metanol/agua/5 M HCl (5/94.9/0.1 v/v/v), mientras la fase Móvil B consiste en acetonitrilo/agua/5 M HCl (50/49.9/0.1 v/v/v). El método es de gradiente aplicado de la siguiente manera: 0 a 5 min 100% A, 5 a 40 min 50% A y 50% B, 40 a 60 min 100% B y de 60 a 65 min 100% B y 65.1 a 70 100% A. El tiempo de corrida es de 70 min seguidos de un periodo de 10 min previos a la siguiente inyección. El volumen de inyección fue 50 μL con flujo 0.7 mL/min.

El eluyente se midió a 254 y 365 nm, y el espectro de los productos se obtuvo en un rango de 220 a 500 nm.

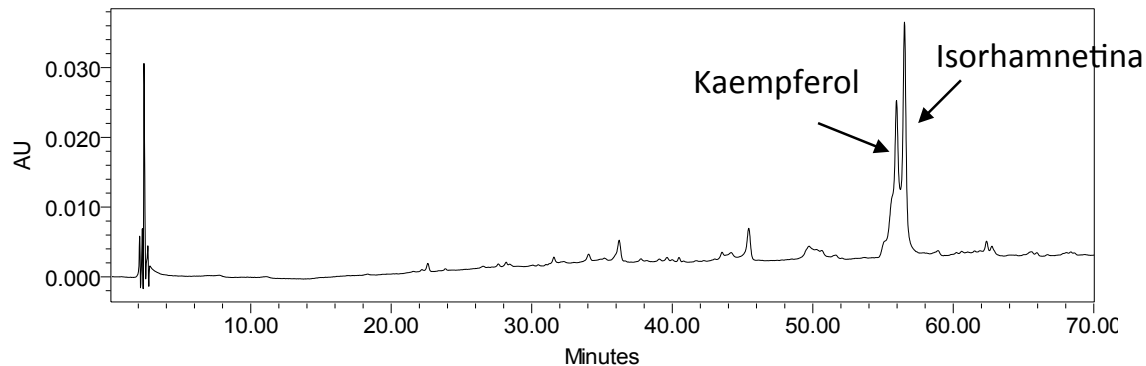


Figura 5. Cromatograma representativo de la extracción de polifenoles de nopal.

B. Estudios in vivo

B.1. Estudio piloto en ratas Zucker (*fa/fa*)

Con el objetivo de determinar la mejor fuente de nopal deshidratado, las concentraciones adecuadas, la tolerancia del modelo a esta fuente de fibra y evaluar de manera preliminar los efectos del consumo del nopal en este modelo de obesidad, se diseñó el siguiente estudio piloto.

B.1.1 Diseño experimental

Se utilizaron 6 ratas macho Zucker obesas (*fa/fa*) (Harlan, México) de 6 semanas de edad y se mantuvieron en el bioterio del Instituto nacional de Ciencias Medicas y Nutrición. Las ratas consumieron la dieta AIN-93G por una semana para aclimatación y posteriormente se dividieron en 3 grupos; 2 ratas se mantuvieron en la dieta control (dieta AIN-93G), 3 ratas se asignaron a la dieta Noplite® 5% (una fuente comercial de nopal deshidratado y la última rata se asignó a la dieta ND 5% (con nopal deshidratado por calor). Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con un ciclo luz/oscuridad de 12 h con libre acceso a la dieta y agua.

A las 2 semanas de haber comenzado el estudio la ratas asignadas al grupo Noplite® 5% presentaron diarrea severa por lo que se regresaron durante 7 días a la dieta AIN-93G y posteriormente se asignaron a una dieta de ND al 2.5%.

El estudio tuvo una duración total de 8 semanas, durante el cual se registró cada tercer día la ganancia de peso y el consumo de alimento. Al final del estudio las ratas se pusieron en ayuno durante 9 h, al final de este periodo una rata control y una rata ND 2.5% se sacrificaron (grupos en ayuno), y al resto se les regresó el alimento por un periodo de 2 h. Al final de este periodo se

sacrificaron el resto de las ratas (C, ND 2.5% y ND 5%) en estado postprandial (grupos postprandio).

Todos los animales se sacrificaron por decapitación, previa inconciencia con CO₂. Se recolectó sangre en tubos con gel separador, se dejaron coagular a temperatura ambiente y se centrifugaron a 1,500 x g durante 10 min para la obtención de suero. Los sueros se guardaron a -70°C hasta su análisis. Se tomaron muestras de hígado que se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C hasta su análisis. Adicionalmente se tomaron muestras de hígado que se almacenaron en formalina al 10% para análisis histomorfológico.

B.1.2. Descripción de la dieta

La formulación de las dietas se presenta en la tabla 3. La dieta control se formuló de acuerdo a la recomendación por la AIN-93G (104) y la dietas con Noplite® y nopal deshidratado se formularon a partir de esta, pero sustituyendo un porción de la fibra dietaría presente en la dieta (celulosa) por fibra de nopal, para obtener 5 y 2.5% de fibra de nopal. El resto de los componentes se ajusto para mantener la misma cantidad de hidratos de carbono y proteína en ambas dietas.

Tabla 3. Formulación de las dietas experimentales, estudio piloto.

Ingrediente	Dieta control (AIN-93G)	Noplite 5%	Nopal deshidratado 5%	Nopal deshidratado 2.5%
Proteína (caseína)	20.0	18.6	14.0	17.0
Almidón	39.7	39.7	35.8	39.7
Maltodextrina	13.2	8.1	0.0	4.6
Sacarosa	10.0	10.0	10.0	10.0
Aceite de soya	7.0	7.0	7.0	7.0
Fibra (celulosa)	5.0	0.0	0.0	2.5
Mineral mix	3.5	4	3.5	3.5
Vitamin mix	1.0	1.0	1.0	1.0
Colina	0.3	0.3	0.3	0.3
L-cistina	0.3	0.3	0.3	0.3
CHO nopal	---	5.1	17.1	8.6
Fibra de nopal	---	5.0	5.0	2.5
Proteína de nopal	---	1.4	6.0	3.0

B.1.3. Curva oral de tolerancia a la glucosa e índice HOMA-IR

Las ratas se mantuvieron en ayuno por 8 h. Se tomaron muestras basales de sangre de la cola obteniendo 0.2 mL en tubos con EDTA. Posteriormente se les introdujo vía oral y un catéter intragástrico para la administración de la solución de glucosa al 30% p/v (3 g/kg de peso). Se tomaron muestras de sangre ordeñando ligeramente la cola durante los siguientes 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min obteniendo de igual manera 0.2 mL para la determinación de glucosa, insulina. Las muestras se centrifugaron a 1000 xg por 10 min para la obtención de plasma. Adicionalmente para evaluar la resistencia a la insulina se calculó el índice HOMA-IR (por sus siglas en inglés Homeostatic Model Assesment) con la siguiente fórmula (glucosa en ayuno, mmol/L x insulina, en ayuno, pmol/L/135).

B.1.4. Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales en suero

La concentración de insulina en suero se determinó por un ensayo de sándwich Elisa (Alpco). La glucosa se determinó por el método automatizado glucosa oxidasa (YSI Model 2700, Yellow Springs, Ohio, USA). Las concentraciones de triglicéridos y colesterol en suero se determinaron con un estuche de Dyasis, por un ensayo enzimático-colorimétrico.

B.1.5. Análisis histomorfológico del hígado

Durante la eutanasia se removieron rápidamente secciones de hígado, se colocaron en formalina al 10% y se guardaron a 4°C para estudios morfológicos. Los tejidos se deshidrataron en series de etanol, xilol (Tabla 4) y posteriormente se embebieron en parafina. Se cortaron secciones de 4 µm de grosor en el micrótopo (Leica). Cada sección se montó en láminas de vidrio y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los análisis morfológicos se realizaron utilizando un analizador de imagen Leica Qwin, acoplado a un microscopio Leica DMLS.

Tabla 4. Deshidratación y embebido de tejidos en parafina.

Reactivo	Tiempo
Etanol 96%	30 min
Etanol 96%	30 min
Etanol 100%	30 min
Etanol 100%	30 min
Xilol 100%	30 min
Xilol 100%	30 min

Parafina a 60°C	30 min
Parafina a 60°C	30 min
Parafina a 60°C	30 min

B.2. Estudio crónico 1, en ratas Zucker (fa/fa)

Una vez establecida la tolerancia del modelo a la dieta con nopal se procedió con el estudio crónico 1.

B.2.1 Diseño experimental

Se utilizaron 24 ratas macho Zucker obesas (*fa/fa*) (Harlan México) de 6 semanas de edad y se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición. Las ratas consumieron la dieta AIN-93G por una semana para aclimatación y posteriormente se dividieron en 2 grupos de 12 ratas y se asignaron las siguientes dietas; Control (dieta AIN-93G) y nopal 4% equivalente al porcentaje de fibra de nopal.

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con un ciclo luz/oscuridad de 12 h con libre acceso a la dieta y agua.

El estudio tuvo una duración de 8 semanas, durante el cual se registró cada tercer día la ganancia de peso y el consumo de alimento. Al final del estudio las ratas se pusieron en ayuno durante 9 h. Al final de este periodo se sacrificaron 6 ratas por grupo (grupos ayuno), y al resto se les regresó el alimento por un periodo de 2 h. Al final de este periodo se sacrificaron 6 ratas por grupo en estado postprandial (grupos postprandio).

Todos los animales se sacrificaron por decapitación, previa inconciencia con CO₂. Se recolectó sangre en tubos con gel separador, se dejaron coagular a temperatura ambiente y se centrifugaron a 1500 x g durante 10 min para la obtención de suero. Los sueros se guardaron a -70°C hasta su análisis. Los hígados se pesaron y se tomaron muestras que se congelaron en nitrógeno y se mantuvieron a -70°C hasta su análisis. Adicionalmente se tomaron muestras de hígado y tejido adiposo que se almacenaron en formalina al 10% para análisis histomorfológico.

B.2.2. Descripción de la dieta

La formulación de las dietas se presenta en la tabla 6. La dieta control se formuló de acuerdo a la recomendación por la AIN-93G (104) y la dieta con nopal se formuló a partir de esta, pero sustituyendo la mayoría de la fibra dietaria presente (celulosa) por fibra de nopal, para obtener 4% de fibra de nopal. El resto de los componentes se ajustó para mantener la misma cantidad de hidratos de carbono y proteína en ambas dietas.

Tabla 5. Formulación de las dietas experimentales.

Composición química %	Dieta control (AIN-93G)	Nopal 4%
Proteína (caseína)	20	17.937
Almidón	39.74	39.74
Maltodextrina	13.2	10.839
Sacarosa	10	10
Aceite de soya	7	7
Fibra (celulosa)	5	1
Minerales	3.5	3.5
Vitaminas	1	1
Colina	0.25	0.25
L-cisteína	0.3	0.3
CHO (nopal)	----	2.361
Fibra (nopal)	----	4
Proteína (nopal)	----	2.0627

B.2.3. Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales en suero

La concentración de insulina y adiponectina en suero se determinó por un ensayo de sándwich Elisa (Alpco). La glucosa se determinó por el método automatizado glucosa oxidasa (YSI Model 2700, Yellow Springs, Ohio, USA). Las concentraciones de triglicéridos y colesterol en suero se determinaron con un estuche de Dysis, por un ensayo enzimático-colorimétrico. El glucagon se determinó por radioinmunoanálisis (Millipore).

La concentración de β -hidroxibutirato en suero se midió de la manera descrita por Galan et al. (105).

B.2.4. Determinación de lipoproteínas en suero

El análisis de lipoproteínas en suero se realizó por espectroscopía acoplada a resonancia magnética nuclear por la compañía Liposcience Inc. (USA). El fundamento de esta técnica radica en que cada subclase de lipoproteínas emite una señal a una frecuencia característica correspondiente al grupo metilo del lípido contenido en la misma. La intensidad de esta señal es proporcional a la cantidad de partículas de cada una de las subclases. En la tabla 7, se

presentan los rangos de tamaño utilizados para evaluar cada subclase de lipoproteínas, las unidades utilizadas y los rangos de precisión de las mediciones.

Tabla 6. Parámetros de lipoproteínas reportadas.

NMR Parámetros de lipoproteínas	Rango de diámetro	Unidades	Precisión de la medida		
			Promedio	DE	%CV
VLDL					
Partículas VLDL (total)		nmol/L	96.4	4.1	4.3
VLDL	>60 nm	nmol/L	4.6	0.2	4.6
Grandes/Quilomicrones					
VLDL medianas	35-60 nm	nmol/L	30.2	1.8	5.9
VLDL pequeñas	27-35 nm	nmol/L	61.6	4.6	7.5
LDL					
Partículas LDL (total)		nmol/L	1404	51.5	3.7
IDL	23-27 nm	nmol/L	39	10.7	27.5
LDL grandes	21.2-23 nm	nmol/L	490	33.5	6.8
LDL pequeñas (total)	18-21.2 nm	nmol/L	876	79.2	9.1
LDL Medianas	19.8-21.2 nm	nmol/L	199	17.2	8.6
pequeñas					
LDL muy pequeñas	18-19.8 nm	nmol/L	676	63.3	9.4
HDL					
Partículas HDL (total)		μmol/L	29.3	0.4	1.5
HDL grandes	8.8-13 nm	μmol/L	9.1	0.4	4.6
HDL medianas	8.2-8.8 nm	μmol/L	2.8	0.8	27.5
HDL pequeñas	7.3-8.2 nm	μmol/L	17.4	0.7	4.1

B.2.5. Determinación de lípidos en hígado

La extracción de lípidos se realizó de la manera descrita por Okuno et al., (106). Brevemente 500 mg de tejido se homogeneizaron en 5 mL de una solución de cloruro de sodio (150 mM), Triton X-100 (0.1%) y Tris (10 mM) a pH 8.0 y a una temperatura entre 40–50°C. La homogenización se realizó en un politrón a máxima velocidad por 60 segundos. Se utilizaron 50 μL del homogenizado para la determinación de triglicéridos y colesterol con el estuche de Dyasis, por un ensayo enzimático-colorimétrico.

B.2.6. Determinación de marcadores de daño hepático en suero

Se utilizó la actividad en suero de la aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) como marcadores de daño hepático. La actividad de AST y ALT se midió con un estuche de Dyasis, por un método enzimático-UV.

B.2.7. Extracción y cuantificaciones de proteínas totales en hígado

Para la extracción de proteínas totales los tejidos se homogeneizaron en amortiguador de lisis RIPA en presencia de inhibidores de proteasas (N-P40 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, aprotinina 72.6 ng/μl, fenilmetilsulfonil fluoruro 319 μg/μl, (Complete Roche) ortovanadato de sodio 3.2 mM y NaF 30 mM, disuelto en PBS) durante 30 min a 4°C. El homogenizado se centrifugó a 10,000 x g durante 15 min. La porción de sobrenadante se recuperó y la concentración de proteína en los extractos se realizó por el método de Lowry (DC, Protein assay, Bio Rad), utilizando albúmina sérica bovina (Bio-Rad) como estándar de concentración para la curva de referencia.

B.2.8. Extracción y cuantificaciones de proteínas mitocondriales en hígado

La obtención de proteínas mitocondriales se realizó conforme a la técnica descrita por Frezza y colaboradores (107). Brevemente, los tejidos se homogeneizaron en buffer de aislamiento de mitocondrias (Tris-MOPS 0.1M, EGTA-Tris 0.1mM y sacarosa 1M) se centrifugaron a 5,000 xg y 4°C por 10 min y se lavó la pastilla dos veces. Para la obtención de proteínas mitocondriales se resuspendió en buffer de lisis (CHAPS 2% en TBS) y el homogenizado se centrifugó a 12,000 xg por 2 min. La porción de sobrenadante se recuperó y la concentración de proteínas en los extractos se realizó por el método de Lowry, utilizando albúmina sérica bovina como estándar de concentración para la curva de referencia.

B.2.9. Electroforesis, transferencia y bloqueo

Para la determinación de las proteínas entre 20 y 40 μg de proteína total se calentaron a 80°C por 5 min en una solución amortiguadora de muestra para corrimiento (Tris 63 mM pH 6.8, glicerol 10.5%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.05% y 2-mercaptoetanol 5%). Posteriormente las proteínas se separaron en geles desnaturalizantes de entre 8 y 10% de bisacrilamida. La condiciones de la electroforesis fueron 75V por 30 min y posteriormente a 100 V entre 100 y 150 min. Las proteínas se electrotransfirieron a 15 V por 30 min a una membrana de polifloruro de vinilideno (PVDF). Para corroborar la transferencia, las membranas se tiñeron con una solución de Ponceau y posteriormente se lavaron tres veces por 5 min con agua desionizada para desteñirlas. El bloqueo de las membranas se realizó con leche descremada en polvo al 5% (Bio-Rad) o albúmina sérica bovina al 0.1% en TBS (Tris 10 mM, NaCl 0.25 M, pH 7.5) con Tween20 al 0.1% de, durante 1 h a temperatura ambiente.

B.2.10. Inmunodetección

El inmunoblot se incubó con los anticuerpos primarios y secundarios de interés (Tabla 8), diluidos en leche baja en grasa al 5% o BSA al 0.1%. Entre la incubación con el anticuerpo primario y el secundario, se hacen 3 lavados con TBS con 0.1% de Tween 20®. Posteriormente, se lleva a cabo la inmunodetección de actina o γ -tubulina como proteína constitutiva y de control de cargado en la misma membrana.

Tabla 7. Anticuerpos y condiciones utilizadas para la inmunodetección.

Bloqueo	Proteína	Anticuerpo primario (dilución)	Tiempo y temperatura de incubación	Anticuerpo secundario (dilución)	Tiempo y temperatura de incubación
Leche 5%	SREBP1c	Anti SREBP1c Santa Cruz (1:500)	Toda la noche 4°C	Anti conejo Santa Cruz (1:3500)	1.5 h, 20-25°C
Leche 5%	ACC	Anti-ACC Millipore (1:1500)	Toda la noche 4°C	Anti conejo Santa Cruz (1:4000)	1.5 h, 20-25°C
Leche 5%	pACC	Anti-pACC Millipore (1:5000)	Toda la noche 4°C	Anti conejo Santa Cruz (1:3500)	1.5 h, 20-25°C
Leche 5%	FAS	Anti-FAS Santa Cruz (1:2000)	Toda la noche 4°C	Anti conejo Santa Cruz (1:3500)	1.5 h, 20-25°C
Leche 5%	CPT1	Anti-CPT1-L (1:800) (108)	Toda la noche 4°C	Anti conejo Santa Cruz (1:10,000)	1.5 h, 20-25°C
Leche 5%	MTTP	Anti-MTTP Santa Cruz (1:50,000)	Toda la noche 4°C	Anti ratón Santa Cruz (1:10,000)	1.5 h, 20-25°C
BSA 0.1%	pIRS	Anti-pIRS en tirosina 941 Millipore (1:1500)	1.5 h a temperatura ambiente	Anti conejo Santa Cruz (1:3500)	1.5 h, 20-25°C
Leche 5%	IRS1	Anti-IRS1 Millipore (1:1500)	Toda la noche 4°C	Anti ratón Santa Cruz (1:3500)	1.5 h, 20-25°C

Leche 5%	AKT	Anti AKT Santa Cruz (1:2,000)	Toda la noche 4°C	Anti conejo Santa Cruz (1:3500)	1.5 h, 20-25°C
BSA 0.1%	pAKT	Anti pAKT en ser 473 Santa Cruz (1:750)	Toda la noche 4°C	Anti conejo (1:3500)	1.5 h, 20-25°C

B.2.11. Revelado y semicuantificación

Las bandas se revelaron con el reactivo de quimioluminiscencia y se procedió a la exposición de la membrana a una película de autorradiografía Kodak MIN-R2000. La semicuantificación de las bandas se realizó por densitometría óptica con el software Image J (NIH). Los valores obtenidos de las proteínas de interés se dividieron entre los valores de actina o tubulina como proteína de expresión constitutiva.

B.2.12. Extracción de ARN y cuantificación

La extracción del RNA total de los tejidos se llevó a cabo por el método Chomczynski (109). Posteriormente 3 µg de RNA se sometieron a electroforesis en un gel con formaldehído 37% y agarosa al 1% para comprobar su integridad. El RNA se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm con un Nanodrop.

B.2.13. Síntesis de cDNA por medio de la reacción de transcriptasa reversa

El RNA se sometió a un análisis de reacción en cadena, de polimerasa en tiempo real, de dos pasos. El primer paso consiste en la obtención de DNA complementario mediante su retrotranscripción. Para este, en un volumen final de 22 µl se preparó una mezcla de reacción que contiene 3000 ng de RNA, amortiguador para la transcriptasa reversa (Tris HCl 50 mM, pH 8.3, KCl 75 mM, y MgCl₂ 3 mM), 0.4 mM de cada uno de los dNTPs, oligonucleotido dT 0.01 µg/µL (el cual contiene de 12 a 18 residuos de timina), inhibidor de RNAasa 1 U/µL y la transcriptasa reversa M-MULV 5 U/µL. La retrotranscripción se llevó a cabo por 1 hora a 42°C y la inactivación de la enzima se hizo por 5 min.

B.2.14. Reacción de PCR en tiempo real y cuantificación relativa

En el segundo paso se llevó a cabo la amplificación de los genes antes mencionados en 22µL de una mezcla de reacción que contiene 1 µL del producto de retrotranscripción, 6 µL de la mezcla maestra, 0.6 µL del oligonucleótido respectivo. La mezcla se colocó en una placa

termocicladora del sistema de detección mencionado. La detección se realizó utilizando sondas Taqman (Applied Biosystems) para cada gen, enlistados en la tabla 9 y para actina como control endógeno para normalizar los valores de expresión.

Tabla 8. Genes analizados y no. de catalogo de sondas Taqman.

Gen	
SREBP1c	Rn01495769_m1
ACC1	Rn00588290_m1
FAS	Rn00569119_m1
PPAR α	Rn00566193_m1
CPT1	Rn00580702_m1
AOX	Rn00569216_m1
MTTP	Rn01522970_m1
PLTP	Rn01423343_m1
CD36	Rn01442639_m1
Actina	Rn00667869_m1

El análisis de la cuantificación relativa se obtuvo usando el valor de CT (threshold cycle). La expresión para el análisis estadístico se calculó por el método comparativo (figura 1A), ajustando la eficiencia de acuerdo a Pfaffl (110). El calculo de la eficiencia se hizo conforme a la siguiente formula: $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$, en donde la pendiente se calculó a partir de la curva estándar realizada para cada sonda y tejido con diluciones 1:10 del cDNA, de 3,000 ng hasta 0.3 ng

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E_{\text{gen interes}})^{\Delta CT_{\text{gen interes (control - muestra)}}}}{(E_{\text{gen endogeno}})^{\Delta CT_{\text{gen endogeno (control - muestra)}}}}$$

B.3. Estudio agudo en ratas Zucker (*fa/fa*)

B.3.1. Diseño experimental

Se utilizaron 10 ratas macho Zucker obesas (*fa/fa*) (Harlan México) de 6 semanas de edad y se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición. Las ratas consumieron la dieta AIN-93G por una semana para aclimatación. Al final de este periodo se

realizo la curva de tolerancia oral a lípidos. Las ratas se mantuvieron en la dieta AIN-93G por una semana mas y posteriormente se realizó la curva de absorción de lípidos.

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con un ciclo luz/oscuridad de 12 h con libre acceso a la dieta y agua.

B.3.2 Curva oral de tolerancia de lípidos

Después de un ayuno de 16 h, se tomaron muestras de sangre basal (de la vena de la cola) y se les administro vía intragástrica un bolo de aceite de oliva (1.4 μ L/g de peso). Posteriormente se recolectaron las muestras de sangre a los 60, 90, 120, 180, 240 y 300 min. El plasma se obtuvo por centrifugación a 3,000 x g por 10 min y se guardó a -70°C hasta su análisis.

B.3.3 Curva de absorción de lípidos

Después de un ayuno de 16 h, se tomaron muestras de sangre basal (de la vena de la cola) y 45 min previos a la administración del bolo se les inyectó vía intraperitoneal 1 g/kg de peso de una solución de 150 mg/mL de poloxamer 407 (P-407, un inhibidor de la lipasa de lipoproteínas). Al finalizar este periodo se les administró vía intragástrica un bolo de aceite de oliva (1.4 μ L/g de peso) y se consideró este como el tiempo cero. Las subsecuentes muestras de sangre se recolectaron a los 60, 120, 180, 240 y 300 min. El plasma se obtuvo por centrifugación a 3000 x g por 10 min y se guardó a -70°C hasta su análisis.

B.4. Estudio crónico 2, en ratas Zucker (*fa/fa*)

B.4.1. Diseño experimental

Se utilizaron 10 ratas macho Zucker obesas (*fa/fa*) (Harlan México) de 6 semanas de edad y se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición. Las ratas consumieron la dieta AIN-93 por una semana para aclimatación y posteriormente se dividieron en 2 grupos de 5 ratas y se asignaron las siguientes dietas: Control (dieta AIN-93G) y nopal 4% equivalente al porcentaje de fibra de nopal.

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con un ciclo luz/oscuridad de 12 h con libre acceso a la dieta y agua.

El estudio tuvo una duración de 8 semanas, durante el cual se registro cada tercer día la ganancia de peso y el consumo de alimento. Una semana previa al final del estudio, las ratas se les realizó una curva oral de tolerancia a lípidos. El último día de estudio las ratas se pusieron

en ayuno durante 16 h, se les realizó una curva de absorción de lípidos y posteriormente se sacrificaron.

Todos los animales se sacrificaron por decapitación, previa inconciencia con CO₂. Se recolectó la sangre en tubos con EDTA y se centrifugó a 3,000 x g durante 10 min para la obtención de plasma. Las muestras de plasma se guardaron a -70°C hasta su análisis. Los hígados y los diferentes compartimentos de tejido adiposo se pesaron y se tomaron muestras que se congelaron en nitrógeno y se mantuvieron a -70°C hasta su análisis. Adicionalmente se tomaron muestras de hígado que se almacenaron en formalina al 10% para análisis histomorfológico.

B.5. Estudio crónico 3, en ratas Sprague Dawley

B.5.1. Diseño experimental

Se utilizaron 42 ratas macho Sprague Dawley (Harlan, USA) de 6 semanas de edad y se mantuvieron en el bioterio de la Universidad de California en Davis. Las ratas se mantuvieron con dieta Chow por una semana para aclimatación y posteriormente se dividieron en 2 grupos (n= 10-36) y se asignaron las siguientes dietas; Control (Research diets No. 12450H) o dieta alta en grasa (HF) (Research diets No. 12451), después de 4 semanas los dos grupos fueron subdivididos; la mitad de los grupos se mantuvo en las control y alta en grasa y la otra mitad se asignó a la dieta control + nopal (C-N) o alta en grasa + nopal (HF-N), por 6 semanas más.

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con un ciclo luz/oscuridad de 12 h con libre acceso a la dieta y agua.

El estudio tuvo una duración de 10 semanas, durante el cual se registró el peso corporal y el consumo de alimento dos veces por semana. Al final del estudio las ratas se pusieron en ayuno durante 14 h y al final de este periodo las ratas se sacrificaron.

Todos los animales se anestesiaron profundamente con isoflurano. Se recolectó sangre por punción cardiaca en tubos con activador de coagulación, se dejaron coagular a temperatura ambiente y se centrifugaron a 1,500 x g durante 10 min para la obtención de suero. Los sueros se guardaron a -70°C hasta su análisis. Los hígados, los compartimentos de tejido adiposo (mesentérico, epididimal, retroperitoneal y subcutáneo), el ciego, el colon y sus contenidos se pesaron. Se tomaron muestras de estos tejidos, se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C hasta su análisis. Adicionalmente se tomaron muestras de hígado, yeyuno y tejido adiposo subcutáneo y mesentérico que se almacenaron en formalina al 10% para el análisis histomorfológico.

B.5.2. Descripción de la dieta

La formulación de las dietas se presenta en la tabla 10. La dieta control (baja en grasa) y la dieta alta en grasa (46% de grasa) fueron formulaciones comerciales obtenidas de Research Diets, USA. Las dietas con nopal se diseñaron a partir de estas dietas con el objetivo de tener una relación fibra de nopal-celulosa 4:1, y mantener el porcentaje de calorías respectivo de cada macronutriente.

Tabla 9. Formulación de las dietas experimentales.

Ingrediente	Control		Control + Nopal		Alta en grasa		Alta en grasa + Nopal	
	g %	Kcal %	g %	Kcal %	g %	Kcal %	g %	Kcal %
Proteína		18		18		18		18
Caseína	19.0		16.5		23.3		20.3	
Proteína de nopal	--		2.1		--		2.6	
L-Cistina	0.3		0.3		0.3		0.3	
Carbohidratos		72		72		36		36
Almidón de maíz	42.9		40.0		8.5		5.6	
Maltodextrinas	7.1		7.0		11.7		11.4	
Sacarosa	16.4		16.1		20.1		19.8	
Carbohidratos de nopal	--		2.2		--		2.7	
Grasa		10		10		46		46
Aceite de soya	2.4		2.3		2.9		2.9	
Manteca	1.9		1.9		20.7		20.3	
Fibra dietaria		--		--		--		--
Celulosa	4.7		0.9		5.8		1.1	
Fibra de nopal	--		3.7		--		4.6	
Mineral Mix S10026	0.9		0.9		1.2		1.1	
Fosfato de dicalcio	1.2		1.2		1.5		1.5	
Carbonato de calcio	0.5		0.5		0.6		0.6	
Citrato de potasio	1.6		1.5		1.9		1.9	
Vitamin mix V10001	0.9		0.9		1.2		1.1	
Bitartrato de colina	0.2		0.2		0.2		0.2	
Total	100.0	100	100	100	100.0	100	100	100
kcal/gm	3.8		3.7		4.6		4.5	

B.5.3. Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales en suero

La concentración de adiponectina y leptina en suero se determinó por un ensayo de sándwich Elisa (Alpco). Las concentraciones de glucosa triglicéridos y colesterol en suero se determinaron por un ensayo enzimático-colorimétrico (Pointe Scientific Inc.).

B.5.4. Determinación de permeabilidad intestinal

Fracciones de intestino se abrieron a lo largo del borde mesentérico y se montaron en las cámaras de Ussing. La apertura de la cámara era de 0.3 cm^2 , y la superficie del tejido estaba expuesta a 2.5 ml de solución Krebs Ringer (KRB) oxigenada a 37°C . El KRB de la superficie apical estaba adicionado con glucosa 16 mM y balanceado osmóticamente con manitol 16 mM en el KRB de la superficie luminal.

La permeabilidad paracelular y transcelular se determinó con FITC-4000 (FD4) (Sigma-Aldrich) y con la peroxidasa de rábano (HRP Tipo II, Sigma-Aldrich) respectivamente. En el tiempo cero, se añadieron 375 mg/L de FD4 y HRP al amortiguador en contacto con la superficie luminal. Posteriormente se recolectaron muestras de 200 μL del amortiguador de la superficie apical cada 30 min, hasta 120 min. Los 200 μL se reemplazaron con KRB para mantener constante el volumen de las cámaras. Una vez terminado el tiempo de muestreo la concentración de FD4 se midió por fluorescencia (excitación 485 nm, emisión 538 nm) en un lector de microplacas, mientras que la concentración de HRP se determinó a 450 nm después de una reacción enzimática utilizando o-dianisidina como sustrato. Los flujos de la superficie luminal hacia la apical se calcularon y expresaron como $\text{ng.cm}^2/\text{h}$.

B.5.5. Análisis histológico de yeyuno y tejido adiposo

Muestras de yeyuno y tejido adiposo mesentérico y subcutáneo se fijaron en formalina y se embebieron en parafina como se explica en la tabla 5. Se cortaron secciones de 8 y 10 μm de diámetro para yeyuno y tejido adiposo, respectivamente y se tiñeron con hematoxilina-eosina. El análisis de las imágenes se realizó con un microscopio Olympus BX61. El largo de las vellosidades se midió con el software (MetaMorph Basic v. 7.7.0.). El área media de los adipocitos se determinó promediando el área de por lo menos 90 adipocitos por rata utilizando el software Image J (National Institutes of Health).

B.5.6. Determinación de especies reactivas de oxígeno

Para la determinación de ERO, se homogeneizaron 50 mg de tejido en amortiguador de fosfatos (PBS) a 4°C y el homogenizado se centrifugó a $5,000 \times g$ durante 5 min. La porción de sobrenadante se recuperó y se diluyó 1:4. En una placa para fluorescencia de 96 pozos, se agregaron 50 μL del extracto, seguido de 50 μL de una solución 5 mM de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína en metanol (Fisher Scientific), se incubó a 37°C durante 1 h y posteriormente se midió la fluorescencia (excitación 488 nm, emisión 525 nm) en un lector de placas. Adicionalmente se midió la concentración de proteína en los extractos por el método de

Lowry (DC, Protein assay, Bio Rad), para normalizar los resultados.

B.5.7. Determinación de la actividad enzimática de la mieloperoxidasa

La actividad de la MPO se determinó en extractos intestinales usando el método o-dianisidina-peróxido de hidrógeno. Brevemente, se homogeneizaron 50 mg de tejido en 50 mM de amortiguador de fosfato de potasio pH = 6.0 adicionado con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) 0.5% por sonicación durante 20 segundos a 4°C. La mezcla se congeló en nitrógeno líquido, se descongeló en un baño de agua y se sonicó nuevamente durante 20 segundos. Este procedimiento se repitió 3 veces y por último las muestras se centrifugaron a 10,000 x g por 30 min. La actividad de la MPO se midió incubando 10 µL de sobrenadante con dihidrocloruro de o-dianisidina 0.167 mg/mL y peróxido de hidrogeno 0.0005%. La absorbancia a 450 nm se midió a los 3, 5 y 7 min y todas las muestras se midieron por triplicado. Adicionalmente se midió la concentración de proteína en los extractos por el método de Lowry (DC, Protein assay, Bio Rad), para normalizar los resultados y poder expresar los resultado en unidades por mg de proteína (U), donde una unidad es la cantidad de enzima necesaria para incrementar 1 unidad de absorbancia por minuto a 25°C.

C. Análisis estadístico

Los datos experimentales en todos los casos se presentan como el promedio \pm SEM (error estándar de la media). La normalidad de los datos se verificó por la prueba Kolmogorov-Smirnov y en caso de obtención de un valor de $p < 0.05$, los datos se transformaron logarítmicamente, previo al análisis estadístico (GraphPad Prism 5).

En todos los casos la diferencia se considero significativa con una $P < 0.05$.

En el estudio preliminar no se realizaron análisis estadísticos, pues a parte de que la n era muy pequeña no se pretendía obtener conclusiones de esta naturaleza.

En el estudio crónico 1, se realizó una la prueba de análisis de varianza de dos vías, considerando como variables la dieta (nopal o control) y el estado fisiológico (ayuno o postprandio). Posteriormente, se aplicó la prueba post hoc de Bonferroni, comparando el efecto de las dietas en ayuno o postprandio así como la diferencia entre las condiciones fisiológicas (ayuno vs postprandio).

El análisis estadístico del estudio agudo se realizó mediante la prueba de análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). Posteriormente, se aplicó la prueba post hoc de Tukey, comparando todos los grupos entre si.

El análisis estadístico del estudio crónico 2, se realizo una t de Student de dos colas para comparar el grupo control contra nopal.

El análisis estadístico del estudio crónico 3 se realizó mediante la prueba de análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). Posteriormente, se aplicó en la mayoría de los casos la prueba post hoc de Tukey, comparando únicamente las condiciones biológicamente relevantes

RESULTADOS

A. Estandarización del modelo

Como se mencionó en los procedimientos las ratas inicialmente asignadas a la versión comercial de nopal deshidratado (Noplite®, Nutriva, México) presentaron una diarrea severa, por esta razón se regresaron a la dieta control durante una semana. Dado que la rata alimentada con nopal deshidratado por calor (ND) presentó una buena tolerancia a la dieta, después del periodo de descanso (en la dieta control) las ratas inicialmente con Noplite se asignaron a la dieta con ND al 2.5% por el resto del estudio. Por este hecho y considerando la naturaleza del estudio (piloto), para el análisis de los datos se agruparon todas las ratas alimentadas con nopal en un solo grupo. Adicionalmente no se realizó análisis estadístico pues la *n* era muy pequeña y no se pretendía obtener conclusiones.

A.1. Ingesta de alimento y peso corporal

Todas las ratas presentaron un crecimiento adecuado, sin embargo los grupos alimentados con nopal exhiben menor ganancia de peso que los grupos control. No se observó diferencia en la ingesta de alimento entre los diferentes grupos (Figura 6).

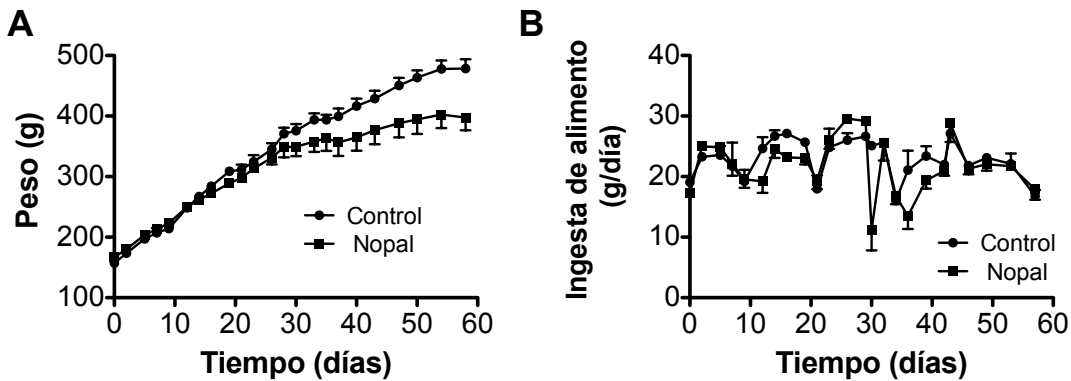


Figura 6. Peso corporal e ingesta de alimento. A) Peso corporal de los grupos durante las 8 semanas de estudio, B) Ingesta de alimento por día durante el periodo de estudio. Promedio \pm EE. *n* = 2-6 por grupo. Considerando la naturaleza del estudio piloto no se realizó análisis estadístico.

A.2. Parámetros bioquímicos

A.2.1. Curvas de tolerancia oral a la glucosa

Con el objetivo de observar el desarrollo de hiperinsulinemia del modelo, así como evaluar de manera preliminar el efecto del consumo de nopal sobre la tolerancia a la glucosa, se realizó una curva inicial de tolerancia a la glucosa y una curva al final de la intervención dietaria. Previo al inicio de la intervención (6 semanas de edad) las ratas presentaron valores de glucosa en ayuno normales, sin embargo durante la curva se observó cierta intolerancia a la glucosa (Figura 7A). Durante esta etapa todas las ratas presentaron hiperinsulinemia moderada. Al finalizar el tratamiento (14 semanas de edad) los valores de glucosa en ayuno de ambos grupos (C y N) se mantuvieron en rangos normales; sin embargo, la intolerancia a la glucosa era más marcada que durante la curva inicial. En cuanto a los valores de insulina, todas las ratas presentaron hiperinsulinemia, sin embargo, las ratas alimentadas con nopal presentaron concentraciones basales de insulina más bajas que las ratas control y regresaron a los valores basales al término de la curva mientras que las ratas control presentaron un tendencia diferente (Figura 7D).

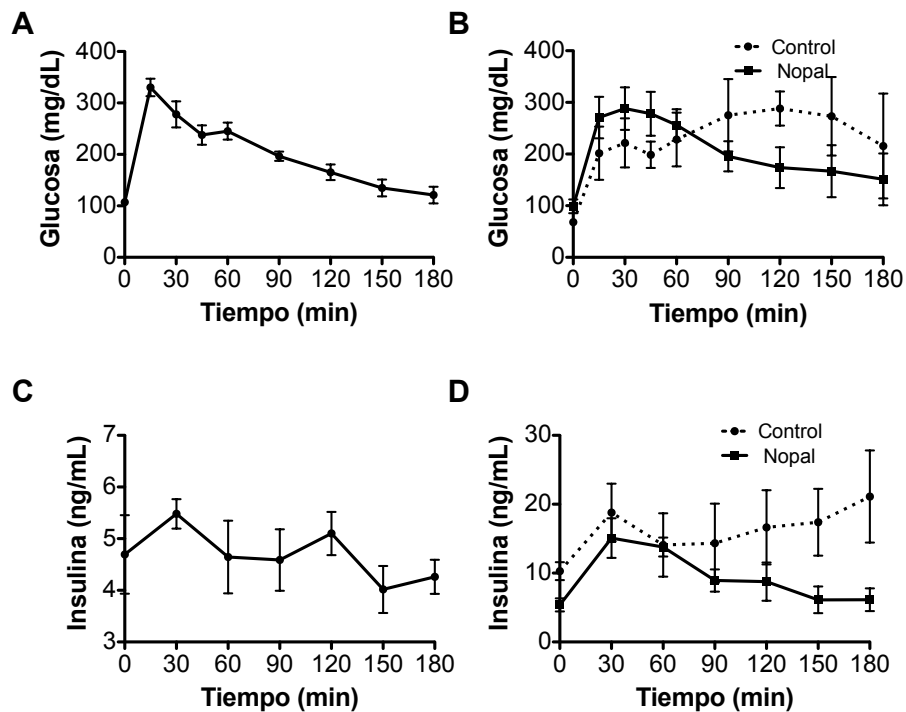


Figura 7. Curvas de tolerancia oral a la glucosa antes y después de la intervención dietaria. A) Valores de glucosa durante la curva basal de tolerancia oral a la glucosa, B) Valores de glucosa durante la curva final de tolerancia a la glucosa, C) Valores de insulina en suero durante la curva basal de tolerancia oral a la glucosa, D) Valores de insulina en suero

durante la curva final de tolerancia a la glucosa. Promedio \pm EE, n = 2-6 por grupo. Considerando la naturaleza del estudio piloto no se realizó análisis estadístico.

A.2.2. Glucosa e insulina

Debido a los resultados obtenidos durante la curva de tolerancia a la glucosa, al término del estudio se evaluaron los niveles de glucosa e insulina en suero tanto en ayuno como en postprandio. En la figura 8A, se observa que en ayuno la rata control tuvo un valor normal de glucosa mientras que la rata alimentada con nopal presentó una hiperglicemia moderada. En postprandio no se observó diferencia entre las dietas. Consistentemente con los resultados de la curva de tolerancia, se observó que todas las ratas desarrollaron hiperinsulinemia, sin embargo esta parece ser mucho más severa en los grupos controles en comparación con los grupos alimentados con nopal (Figura 8B).

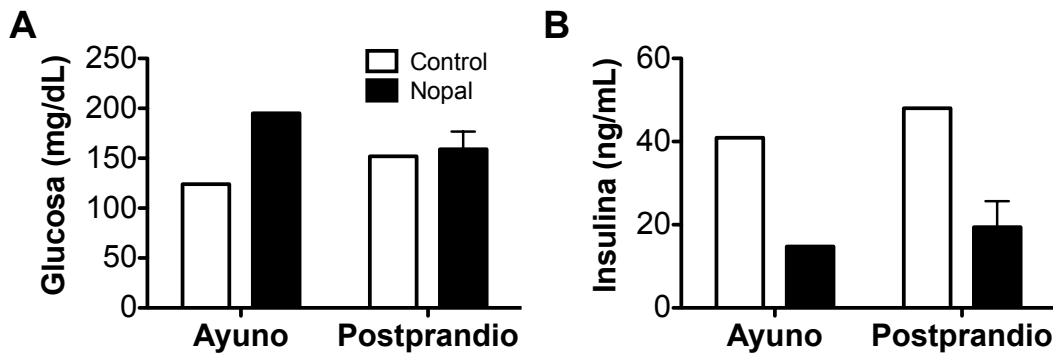


Figura 8. Valores de glucosa e insulina en suero. A) Concentraciones de glucosa en suero de ratas C y N en ayuno y postprandio, B) Concentraciones de insulina en suero. Promedio \pm EE. n = 1-2 por grupo. Considerando la naturaleza del estudio piloto no se realizó análisis estadístico.

A.2.3. Triglicéridos y colesterol

En la figura 9A se observa que las ratas alimentadas con nopal parecen tener valores mayores de triglicéridos en comparación con los grupos controles tanto en ayuno como en postprandio. Por el contrario la concentración de colesterol en suero parece ser mas baja en las ratas alimentadas con nopal en comparación con las ratas control (Figura 9B).

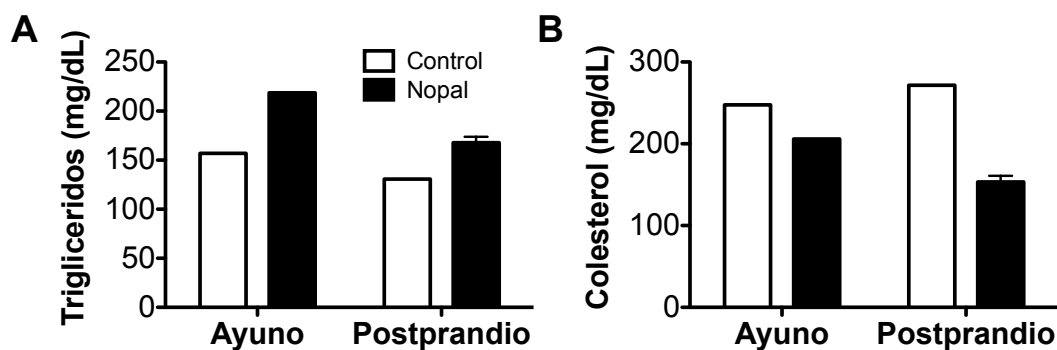


Figura 9. Valores de colesterol y triglicéridos, en suero. A) Triglicéridos de ratas en ayuno y postprandio, B) Colesterol total de las ratas en ayuno y postprandio. Valores promedio \pm EE. $n = 1-2$ por grupo. Considerando la naturaleza del estudio piloto no se realizó análisis estadístico.

A.3. Histomorfología

La rata Zucker (*fa/fa*) obesa desarrolla esteatosis hepática de manera natural (102). En las histologías (Figura 10), se observa que las ratas control tanto en ayuno como en postprandio presentan acúmulos de lípidos, tanto en vacuolas citoplasmáticas que segregan el núcleo hacia la periferia, como en vacuolas pequeñas que producen balonización de los hepatocitos, lo cual se puede traducir en esteatosis tanto macro como microvesicular. Las ratas alimentadas con nopal presentan estos acúmulos de lípidos pero en mucho menor proporción.

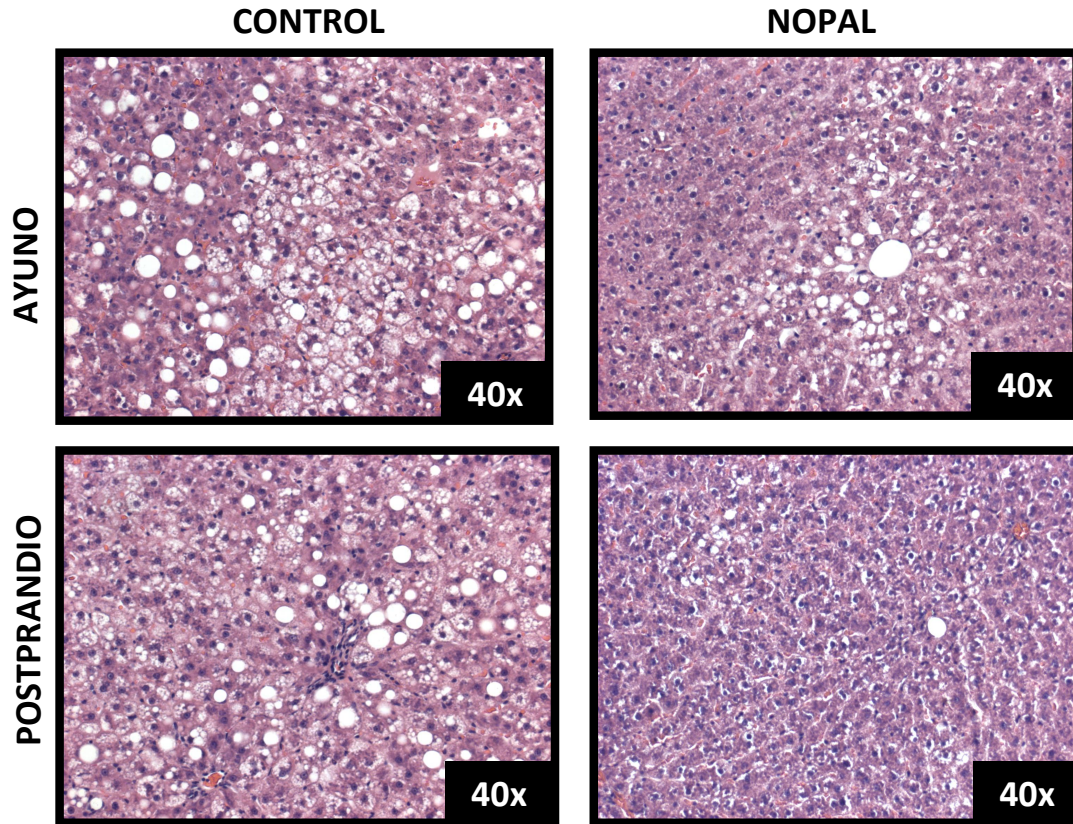


Figura 10. Análisis histológico de los hígados de las ratas alimentadas con la dieta Control o con Nopal por 7 semanas (fotografías representativas). n = 1-2 por grupo.

B. Efecto del consumo de nopal sobre el desarrollo de esteatosis hepática en ratas Zucker (*fa/fa*). Estudio crónico 1

Gracias al estudio preliminar se determinó que la fuente de nopal adecuada era el nopal deshidratado por calor. Adicionalmente se decidió utilizar una concentración de 4% de nopal en la dieta, en sustitución mayoritaria de la celulosa presente en la dieta control, para evitar que los animales desarrollaran diarrea.

B.1. Ingesta de alimento, ganancia de peso corporal y peso de los hígados

No se observó ninguna diferencia entre la ingesta diaria promedio de alimento entre el grupo control y el grupo de nopal (Figura 11). De igual manera no hubo una diferencias en la ganancia de peso entre las ratas alimentadas con la dieta control y las ratas alimentadas con nopal.

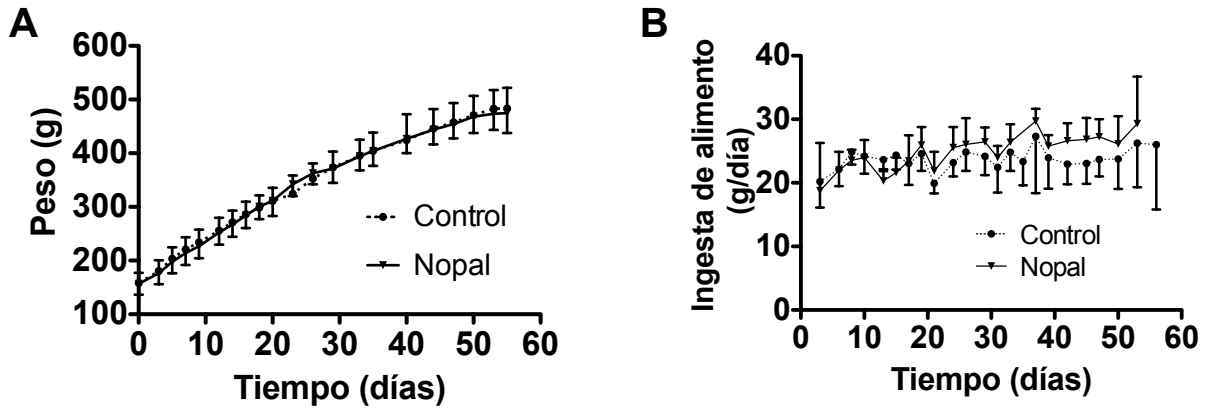


Figura 11. Peso corporal e ingesta de alimento. A) Peso corporal de los grupos durante las 8 semanas de estudio, B) Ingesta de alimento por día durante el periodo de estudio. Valores promedio \pm EE. n = 12 por grupo.

Como se mencionó anteriormente una de las anomalías metabólicas presentadas por la rata Zucker (*fa/fa*) obesa es el desarrollo esteatosis hepática (102). Uno de los indicadores de la esteatosis hepática es la hepatomegalia derivada de la acumulación de lípidos en este tejido. Dado que algunas fibras dietarias disminuyen el acúmulo de lípidos en hígado (78), y considerando los resultados preliminares se evaluó el peso relativo de los hígados. En la Figura 12, se observa que las ratas alimentadas con nopal presentaron una disminución significativa en el peso relativo de los hígados (peso del hígado/peso corporal) ($p < 0.0001$) con respecto a las ratas controles. En ayuno el grupo alimentado con nopal presentó una reducción en el peso relativo del hígado de 21% respecto al control, mientras que en postprandio la reducción del grupo N vs C fue del 22%. El estado fisiológico (ayuno vs postprandio) no tuvo un efecto significativo sobre el peso de los hígados.

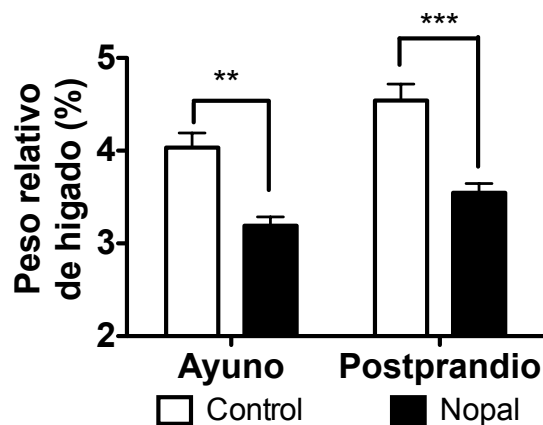


Figura 12: Peso de hígados en función del peso corporal. Valores promedio \pm EE. n = 5-6 por grupo. **P<0.01, *P<0.0001.**

B.2. Parámetros bioquímicos en suero

B.2.1. Curvas de tolerancia a la glucosa

De acuerdo con la literatura (111) y como ya se había observado en el estudio preliminar, la rata Zucker (*fa/fa*) desarrolla naturalmente hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa; para determinar si el consumo de nopal previene de alguna manera el desarrollo de estas anomalías se realizaron curvas de tolerancias a la glucosa en la semana cero (antes de la intervención) (n = 6) y 7 semanas después del consumo de la dieta (n = 3).

A las 7 semanas de edad las ratas presentaron valores normales de glucosa en ayuno, una ligera intolerancia a la glucosa y una moderada hiperinsulinemia (Figura 13A y 13B). A las 14 semanas de edad (Figura 13C y 13D), ambos grupos presentaron moderada hiperglucemia e hiperinsulinemia severa; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las ratas alimentadas con la dieta control y las ratas alimentadas con nopal.

Adicional a las curvas de tolerancia a la glucosa se calculó el índice HOMA-IR con el objetivo de corroborar cambios en las resistencia periférica a la insulina. De manera similar a lo observado en las curvas de tolerancia a la glucosa, no se observaron diferencias significativas en el índice HOMA-IR entre las ratas control (164.6 ± 35.54) y las ratas alimentadas con nopal (124.6 ± 24.24).

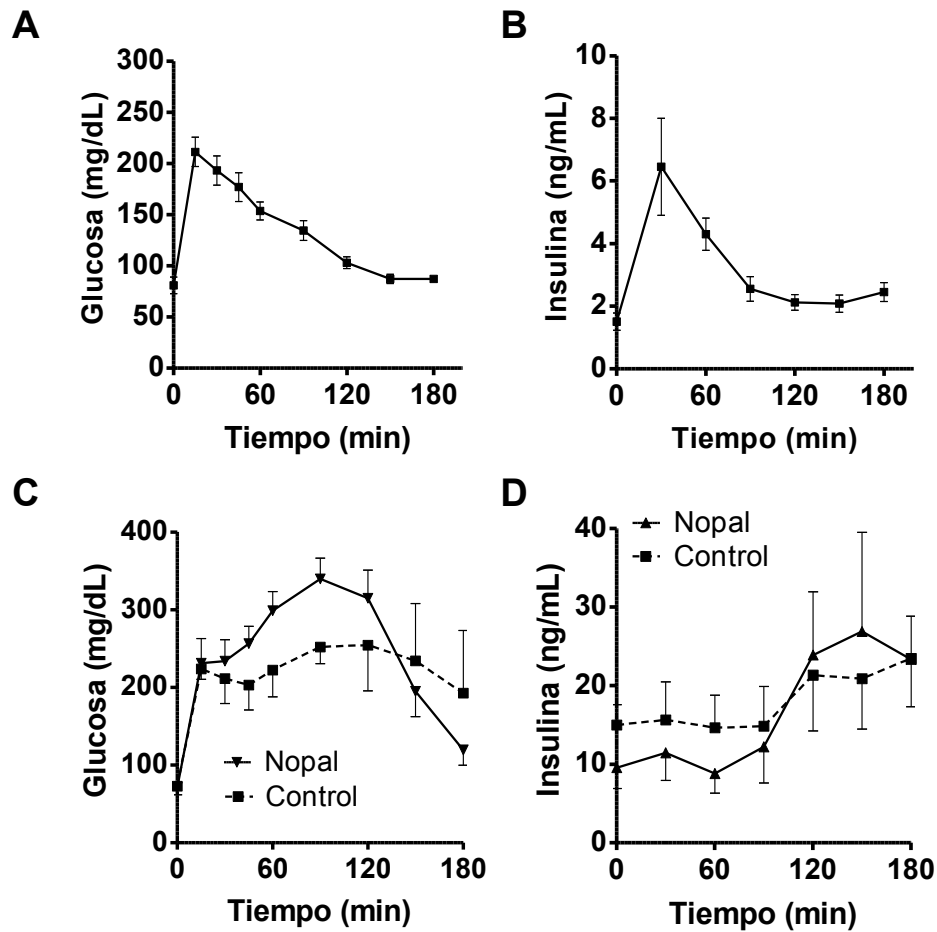


Figura 13. Curvas de tolerancia oral a la glucosa antes y después de la intervención dietaria. A) Valores de glucosa durante la curva basal de tolerancia oral a la glucosa, B) Valores de insulina en suero durante la curva basal de tolerancia oral a la glucosa, C) Valores de glucosa durante la curva final de tolerancia a la glucosa, D) Valores de insulina en suero durante la curva final de tolerancia a la glucosa. Valores promedio \pm EE. n = 3-6 por grupo.

B.2.2. Glucosa, insulina y glucagon

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de glucosa en suero tanto entre las diferentes dietas como entre ayuno y postprandio (Figura 14A). La Figura 14B muestra que todas las ratas del estudio desarrollaron la hiperinsulinemia característica de este modelo de obesidad y no mostraron diferencias significativas en las concentraciones de insulina en ayuno. Por el contrario en el estado postprandial las ratas alimentadas con nopal presentaron valores de insulina significativamente menores a las ratas control.

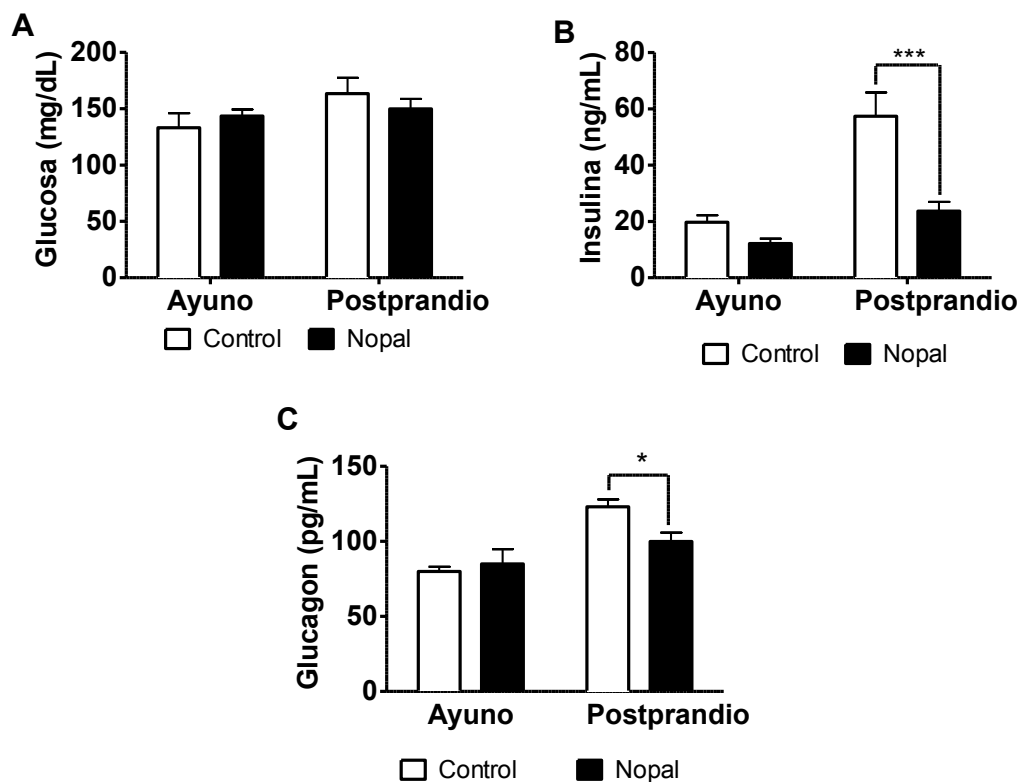


Figura 14. Valores de glucosa, insulina y glucagón en suero. A) Concentraciones de glucosa en suero de ratas C y N en ayuno y postprandio, B) Concentraciones de insulina en suero de las ratas C y N tanto en ayuno como en postprandio, C) Concentraciones de glucagón en suero las ratas C y N tanto en ayuno como en postprandio. Valores promedio \pm EE. $n = 5-6$ por grupo. * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$.

El glucagón tiene un papel importante en la homeostasis de glucosa (112). Si bien las dietas altas en proteína pueden incrementar la secreción de glucagón postprandial (113), se ha observado que en la diabetes tipo 2, la secreción de glucagón postprandial está incrementada. Esto resulta en una inadecuada supresión de la gluconeogénesis hepática y por lo tanto en una desregulación de la homeostasis de glucosa (114). Considerando lo anterior y los resultados obtenidos en los valores de insulina decidimos evaluar las concentraciones de glucagón en suero. En ayuno los niveles de glucagón (Figura 14C) no mostraron diferencias entre las diferentes dietas (C vs N). Sin embargo en el estado postprandial las ratas alimentadas con nopal mostraron valores significativamente menores que el grupo control. Adicionalmente las ratas alimentadas con la dieta control mostraron un incremento significativo en los valores

postprandiales en comparación con el ayuno ($p < 0.0001$) mientras que los grupos alimentados con nopal no mostraron diferencias entre ayuno vs postprandio.

B.2.3 Perfil de lípidos

B.2.3.1. Triglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres

Algunos de los efectos observados por el consumo de diferentes tipos de fibras dietarias es la modulación de los niveles de triglicéridos y colesterol en suero.

Los valores de triglicéridos séricos en ayuno (Figura 15A), fueron similares entre el grupo control y el de nopal. Sin embargo, de manera interesante, en el estado postprandial los valores de las ratas alimentadas con nopal fueron significativamente mayores ($p = 0.0002$) en comparación con el grupo control.

Acorde con reportes previos (24), las ratas alimentadas con nopal presentaron valores de colesterol total significativamente menores que las controles ($P = 0.0002$), tanto en ayuno como en postprandio (2 h de alimentación) (Figura 12B).

Una de las características asociadas a la obesidad, es el incremento en el flujo de ácidos grasos libres provenientes de la lipólisis del tejido adiposo (50) que pueden ser depositados en tejidos no grasos como músculo e hígado. De esta manera, se decidió medir los niveles de ácidos grasos libres en suero. Como se observa en la Figura 15C, en ayuno la concentración de ácidos grasos libres se encuentran relativamente alta en ambos grupos. En contraste, en postprandio los valores son significativamente menores que en ayuno ($p < 0.0001$). Sin embargo no se observaron diferencias entre las dietas experimentales (control o nopal).

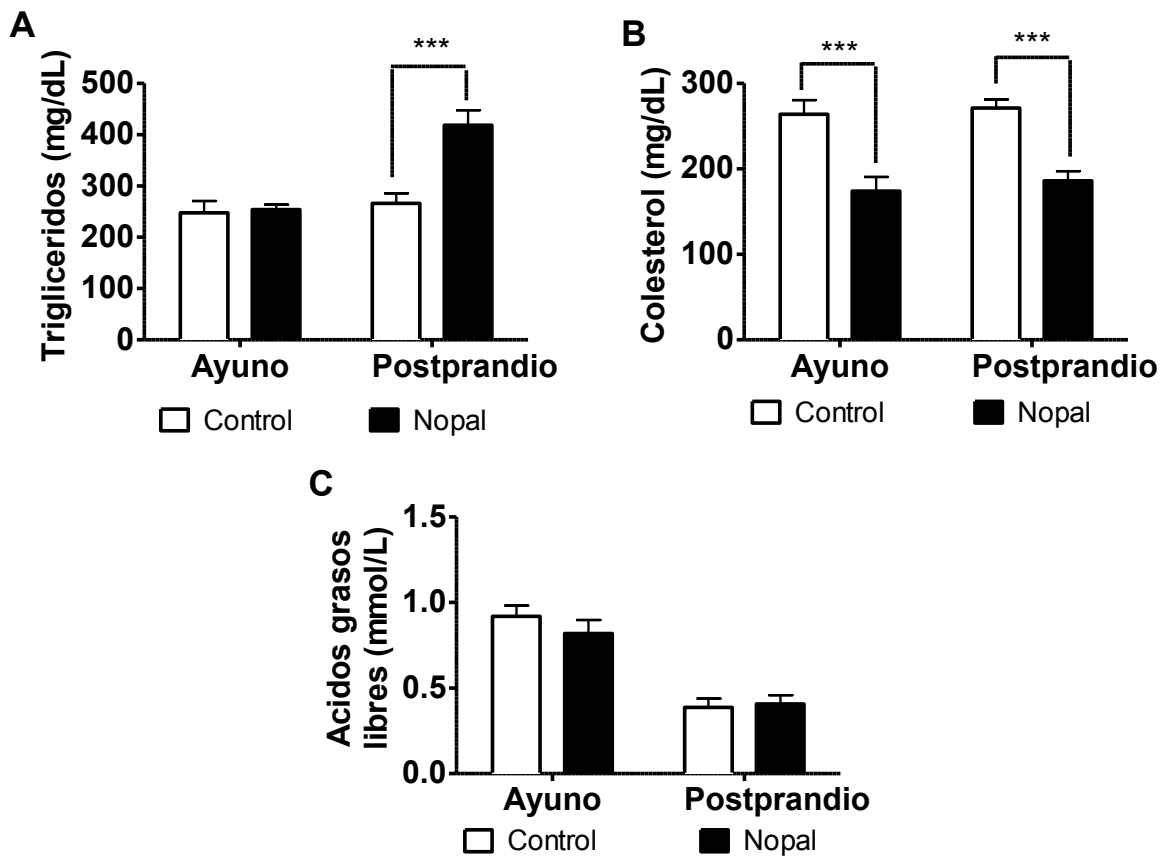


Figura 15. Valores de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres en suero. A) Triglicéridos de ratas en ayuno y postprandio, B) Colesterol total de las ratas en ayuno y postprandio, C) Ácidos grasos libres de las ratas en ayuno y postprandio. Valores promedio \pm EE. n = 5-6. ***P<0.0001.

B.2.3.2. Lipoproteínas (Quilomicrones, VLDL y LDL)

Debido a las diferencias observadas entre los grupos control y los grupos alimentados con nopal en los valores séricos de colesterol y triglicéridos postprandiales, se realizó el perfil de lipoproteínas en suero con el objetivo de identificar variaciones en las diferentes subclases. De acuerdo con el resultado de triglicéridos en suero, el contenido de partículas de muy baja densidad y ricas en triglicéridos (VLDLs y quilomicrones) en postprandio fue mucho mayor en los grupos alimentados con nopal (Figura 16B). En ayuno se observó una tendencia similar pero en menor magnitud (Figura 16A). En contraste la cantidad de LDLs (lipoproteínas de baja densidad y ricas en colesterol) fue menor en los grupos alimentados con nopal en comparación con los controles tanto en ayuno como en postprandio (Figura 16C y D).

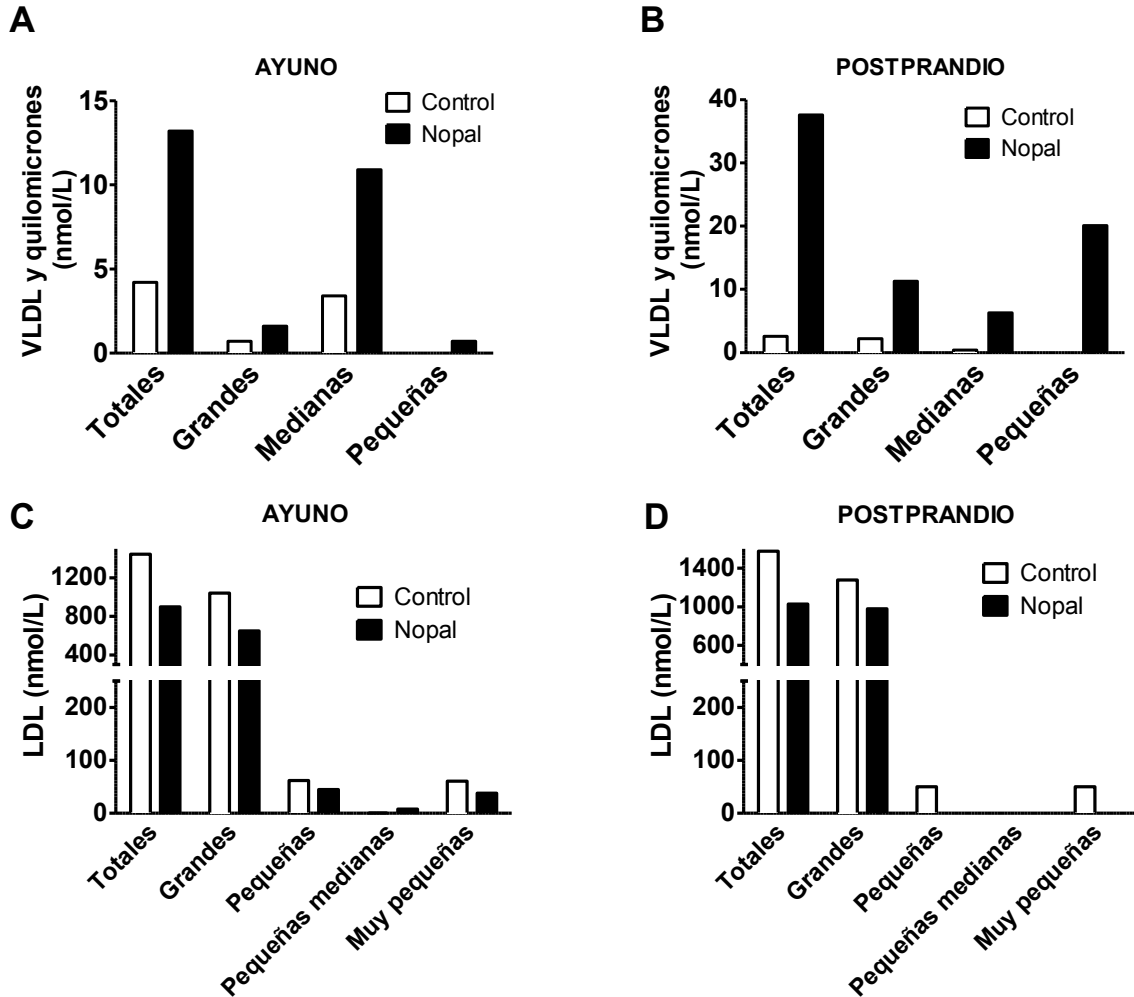


Figura 16. Valores de las diferentes subclases de lipoproteínas en suero. A) Valores de las diferentes subclases de VLDL y quilomicrones de las ratas en ayuno, B) Valores de las diferentes subclases de VLDL y quilomicrones de las ratas en postprandio, C) Valores de las diferentes subclases de LDL de las ratas en ayuno, D) Valores de las diferentes subclases de VLDL y quilomicrones de las ratas en postprandio. Debido a la cantidad necesaria de muestra para el análisis se realizaron mezclas de las diferentes ratas, por lo que no se realizó análisis estadístico.

B.2.4. Adiponectina

Se ha descrito una asociación significativa entre valores bajos de adiponectina en suero y la presencia de esteatosis hepática (58), de esta manera se midió esta adipocina en suero. En la Figura 17, se observa que no hubo un efecto del estado fisiológico (ayuno vs postprandio) sobre los niveles séricos de adiponectina para ninguna de las dietas. En comparación, los grupos

alimentados con nopal presentaron un incremento significativo ($p < 0.0001$) en los valores de adiponectina en suero en comparación con los grupos control y este incremento fue independiente del estado fisiológico (ayuno o postprandio).

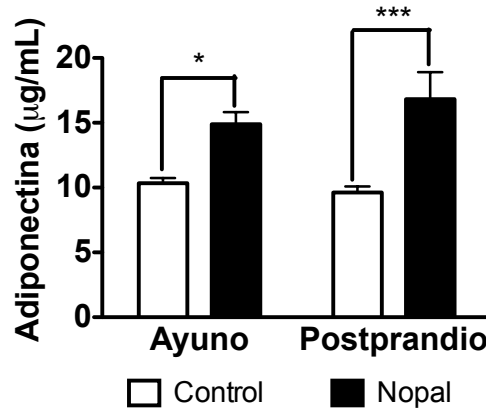


Figura 17. Valores de adiponectina total en suero de las ratas en ayuno y postprandio.

Valores promedio \pm EE. $n=5-6$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$

B.2.5. Cuerpos cetónicos (β -hidroxibutirato)

Uno de los indicadores de una alta tasa de oxidación de ácidos grasos en hígado son los niveles de cuerpos cetónicos (acetoacetato y β -hidroxibutirato) en suero. De esta manera se evaluaron los niveles de β -hidroxibutirato en el suero de las ratas. No se observaron diferencias significativas entre las dietas en ayuno o postprandio, sin embargo sí se observó un efecto significativo del estado fisiológico (ayuno vs postprandio) (Figura 18). Los valores de ayuno fueron significativamente mayores que los de postprandio para ambas dietas ($P=0.002$).

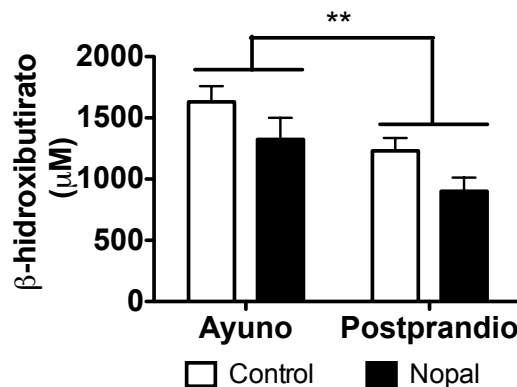


Figura 18. Valores de β -hidroxibutirato en suero de las ratas en ayuno y postprandio.

Valores promedio \pm EE. $n=5-6$ por grupo.

B.2.6. Marcadores de daño hepático

Durante el desarrollo de esteatosis hepática, el indicador clínico más usado es la actividad de transaminasas (ALT y AST) en suero. Todas las ratas presentaron valores por arriba de los rango normales (Figura 19) (115); sin embargo, las ratas alimentadas con nopal presentaron valores significativamente más bajos de ALT en ayuno ($P < 0.05$). Los resultados de AST siguen la misma tendencia, aunque los valores de las ratas alimentadas con nopal son significativamente menores tanto en ayuno como en postprandio ($P < 0.05$).

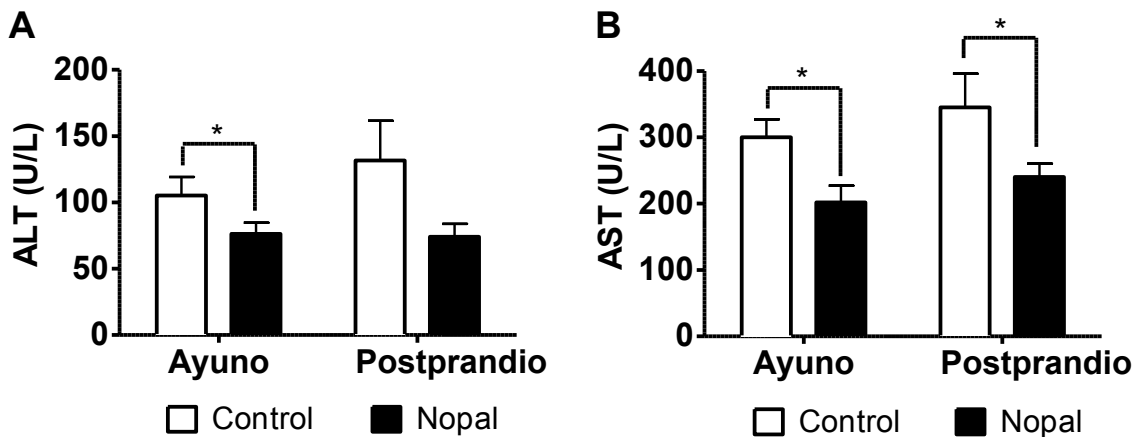


Figura 19. Pruebas de daño hepático en suero. A) Actividad de ALT en suero, B) Actividad de AST en suero. Valores promedio \pm EE. $n=5-6$ por grupo. $*P < 0.05$

B.3. Metabolismo de lípidos en hígado

Considerando los resultados observados en el peso relativo de los hígados, y con el objetivo de observar la acumulación de lípidos en hígado para comprobar la presencia de esteatosis, se realizaron cortes histológicos de los hígados.

B.3.1. Histomorfología

En la histología teñida con hematoxilina-eosina (Figura 20) se observa que acorde con los resultados del estudio piloto, las ratas alimentadas con la dieta control tanto en ayuno como en postprandio presentan vacuolas lipídicas tanto del tipo macro como microvesicular, lo que se traduce una esteatosis mixta. En contraste las ratas alimentadas con nopal exhibieron presencia de estas vacuolas pero en mucho menor proporción.

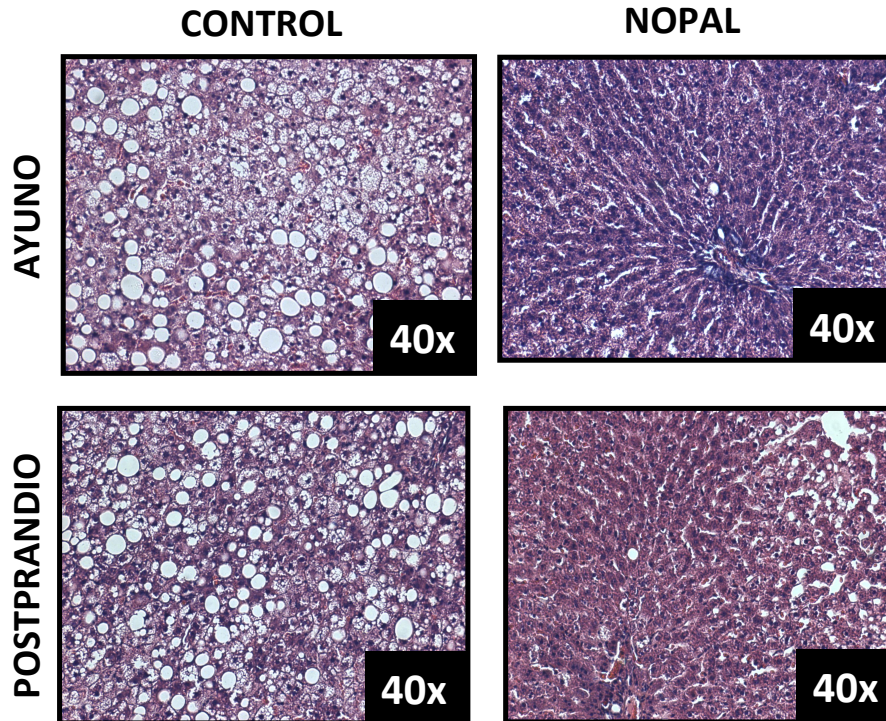


Figura 20. Análisis histológico de los hígados de las ratas alimentadas con la dieta control o con nopal por 7 semanas (fotografías representativas). n = 5-6 por grupo.

B.3.2. Triglicéridos y colesterol hepáticos

Para corroborar la disminución de esteatosis observada en los hígados de las ratas alimentadas con nopal, se realizó la cuantificación de triglicéridos y colesterol en hígado.

El contenido de triglicéridos hepáticos (Figura 21A) fue significativamente menor en los grupos alimentados con nopal, tanto en ayuno como en postprandio ($p < 0.0001$). Las ratas alimentadas con nopal en ayuno presentaron una disminución de 42% respecto al control, mientras que en postprandio la reducción del grupo N vs C fue del 59%. No se observó diferencia significativa en los niveles de colesterol hepático en ninguno de los grupos (Figura 21B).

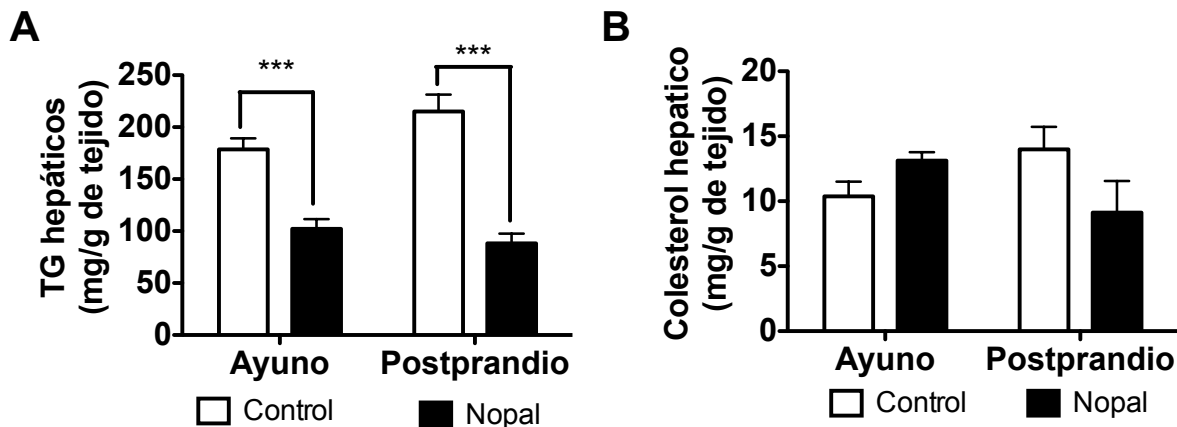


Figura 21. Valores de Colesterol y triglicéridos hepáticos. A) Triglicéridos en ayuno y postprandio, C) Colesterol hepático de ratas en ayuno y postprandio. Valores promedio \pm EE. $n=5-6$. *** $P<0.0001$.

B.3.3. Expresión de proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos

Los resultados anteriores indican claramente que el consumo de nopal previene la acumulación de lípidos en el hígado de la rata Zucker (*fa/fa*). Considerando que la esteatosis hepática se origina a partir de un desbalance entre la captura, síntesis, oxidación y exportación de lípidos en hígado, se midió la expresión génica y de proteína de las proteínas claves involucradas en el metabolismo de lípidos.

B.3.3.1. Captura de ácidos grasos

Para determinar el efecto sobre la captura de ácidos grasos en el hígado se midió la expresión del transportador CD36. No se observó un efecto de la dieta en la expresión de este transportador en ayuno (Figura 22). En comparación, en postprandio la expresión de CD36 en el grupo alimentado con nopal fue significativamente mayor que en el grupo control. No se observó un efecto del estado fisiológico.

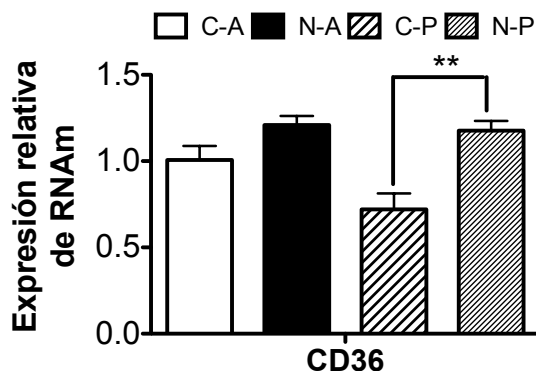


Figura 22. Expresión del transportador de ácidos grasos CD36 en hígado. Promedio \pm EE. n=5-6 por grupo. **P<0.01. C-A: Control ayuno, N-A: Nopal ayuno, C-P: Control postprandio, N-P: Nopal postprandio

B.3.3.2. Síntesis de lípidos

Para determinar el efecto sobre la síntesis de ácidos grasos, se midió la expresión génica del factor de transcripción SREBP1c, así como de sus genes blanco ACC1 y la sintasa de ácidos grasos (FAS). En la Figura 23A, se observa que la expresión génica de SREBP1c, un factor de transcripción clave en lipogénesis, no se modificó entre el grupo control y los grupos alimentados con nopal en ayuno. Sin embargo, en el estado postprandial se observó un incremento significativo en el grupo alimentado con nopal con respecto al control postprandio. La expresión génica de su gen blanco ACC1 presentó un patrón similar en postprandio aunque también aumentó significativamente en ayuno. Por el contrario, en la expresión de FAS no se observaron diferencias entre las dietas, aunque sí hubo un efecto del estado fisiológico en donde para ambas dietas se observó un incremento en postprandio en comparación con el ayuno (P<0.0001).

La expresión de la proteína madura de SREBP1c presenta un patrón similar al de la expresión génica, en donde no se observaron diferencias en ayuno, aunque sí se observó un incremento significativo en postprandio para el grupo alimentado con nopal, en comparación con el control (P<0.01). Una de las formas de regulación de ACC, es por fosforilación, de esta manera si la proteína se encuentra fosforilada se considera inactiva. Tanto en ayuno como en postprandio la relación pACC/ACC total pareciera incrementarse en los grupos alimentado con nopal respecto a sus controles respectivos aunque la diferencia no alcanzó significancia. Finalmente los niveles de proteína de FAS no presentaron diferencias entre ninguno de los grupos (Figura 23C).

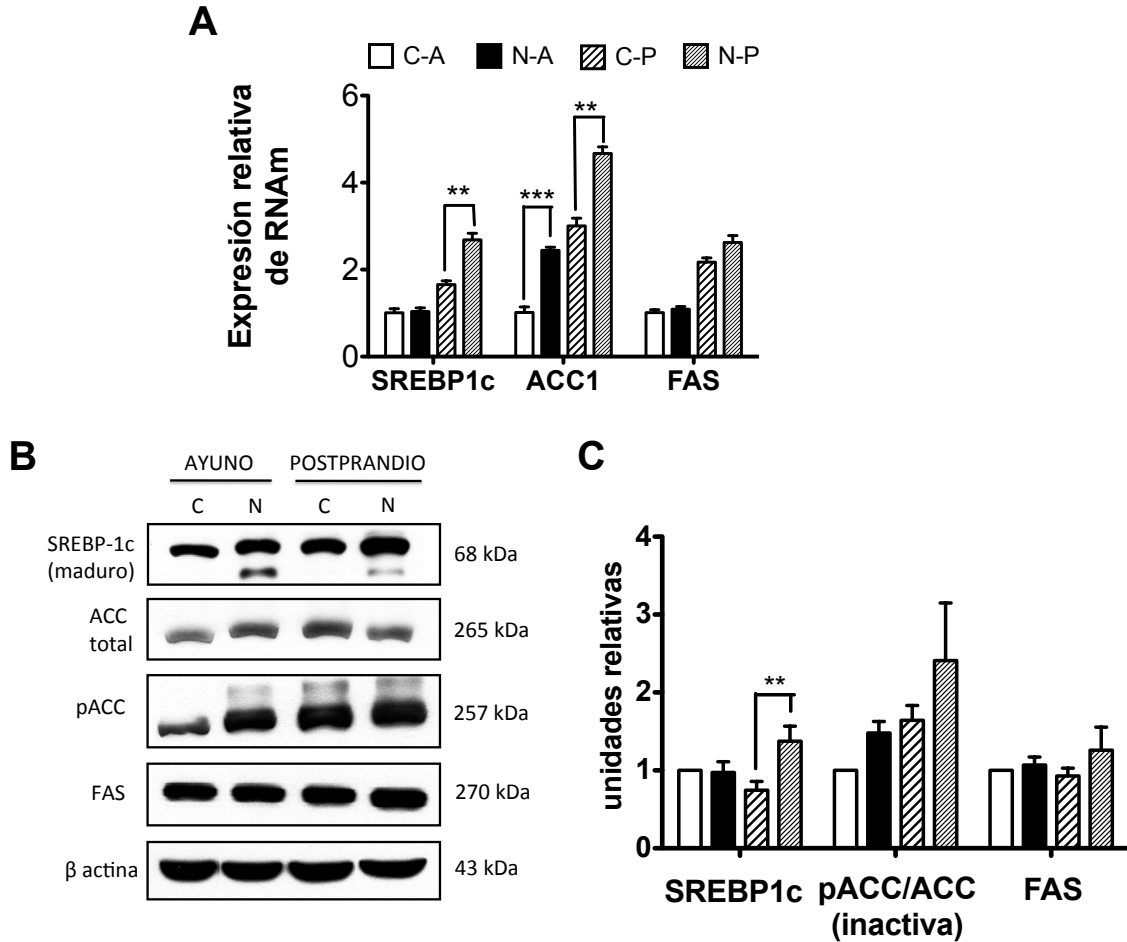


Figura 23. Expresión de proteínas involucradas en lipogénesis en hígado, A) Expresión génica del factor de transcripción SREBP1c, la enzima acetil coA carboxinasa (ACC1) y la sintasa de ácidos grasos (FAS) en ayuno y postprandio, B) Inmunoblots representativos de la expresión y fosforilación de enzimas involucradas en lipogénesis, C) Cuantificación relativa de la expresión de proteína de SREBP1c, la sintasa de ácidos grasos (FAS) y fosforilación de ACC en ayuno y postprandio. Promedio \pm EE. $n=5-6$ por grupo, $**P<0.01$, $***P<0.0001$. C-A: Control ayuno, N-A: Nopal ayuno, C-P: Control postprandio, N-P: Nopal postprandio

B.3.3.3 Oxidación de lípidos

Para evaluar la oxidación de ácidos grasos en hígado se midió la expresión génica de PPAR α , un factor de transcripción y regulador clave en la oxidación de lípidos, así como sus genes blanco; carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1) y acil coA oxidasa (AOX) que son enzimas claves en la oxidación de ácidos grasos mitocondriales y peroxisomales, respectivamente. Como se puede ver en la Figura 24A, en la ratas alimentadas con nopal hubo un incremento

significativo en la expresión génica de PPAR α , así como de su genes blanco CPT1 y AOX en ayuno, en comparación con las control. Adicionalmente CPT1, en postprandio presentó mayor expresión en el grupo con nopal en comparación con el control. La expresión de la proteína CPT1 (Figura 24B) en ayuno, presentó un patrón similar a la expresión génica, donde el grupo con nopal mostros valores significativamente mayores que el control, aunque no se observaron diferencias entre las dietas en postprandio. Dado que esta enzima es clave en el transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria para su oxidación y se considera como la enzima paso limitante de la oxidación mitocondrial, los resultados anteriores sugieren que la oxidación de ácidos grasos en el hígado de las ratas alimentadas con nopal, pudiera estar incrementada en ayuno en comparación con las ratas control.

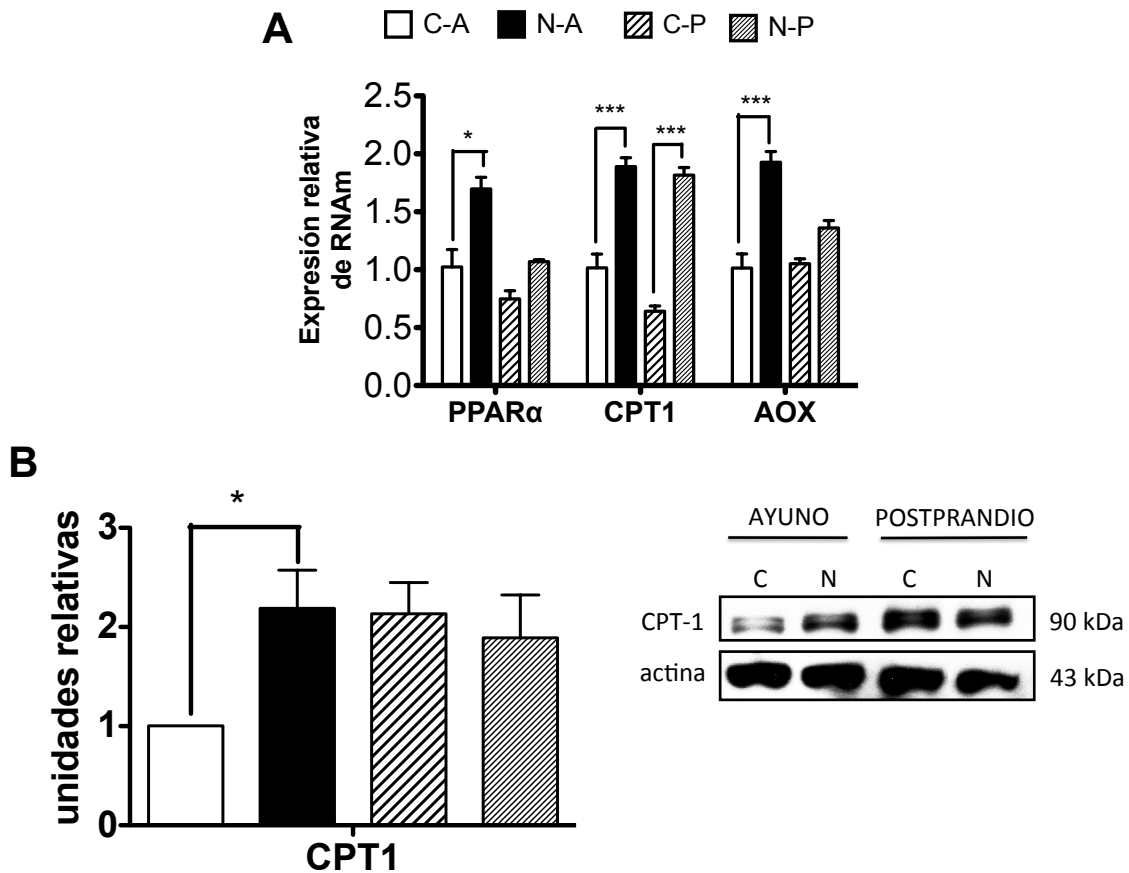


Figura 24. Expresión de genes y proteínas involucrados en la oxidación de lípidos en hígado. A) Expresión de PPAR α , carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1) y AOX en ayuno y postprandio, B) Expresión de la proteína CPT1 en mitocondrias de hígado en ayuno y postprandio. Promedio \pm EE, n=5-6 por grupo. *P<0.05, ***P<0.0001. C-A: Control ayuno, N-A: Nopal ayuno, C-P: Control postprandio, N-P: Nopal postprandio

B.3.3.4 Síntesis y exportación de lipoproteínas

Debido al incremento observado en ayuno en las partículas ricas en triglicéridos, se analizó la expresión de la proteína microsomal para transferencia de triglicéridos (MTTP) la cual es responsable de la transferencia de triglicéridos a las VLDLs nacientes. Tanto la expresión génica como de la proteína aumentaron significativamente en ayuno (Figura 25). En contraste, la expresión génica en postprandio disminuyó en el grupo alimentado con nopal en comparación con el control. A nivel de proteína no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Además de la expresión de MTTP, se midió la expresión génica de la enzima responsable de la transferencia de fosfolípidos a las VLDLs; PLTP. En ayuno, al igual que MTTP, la expresión génica de PLTP aumentó significativamente en el grupo alimentado con nopal, mientras que en postprandio no se observaron diferencias significativas.

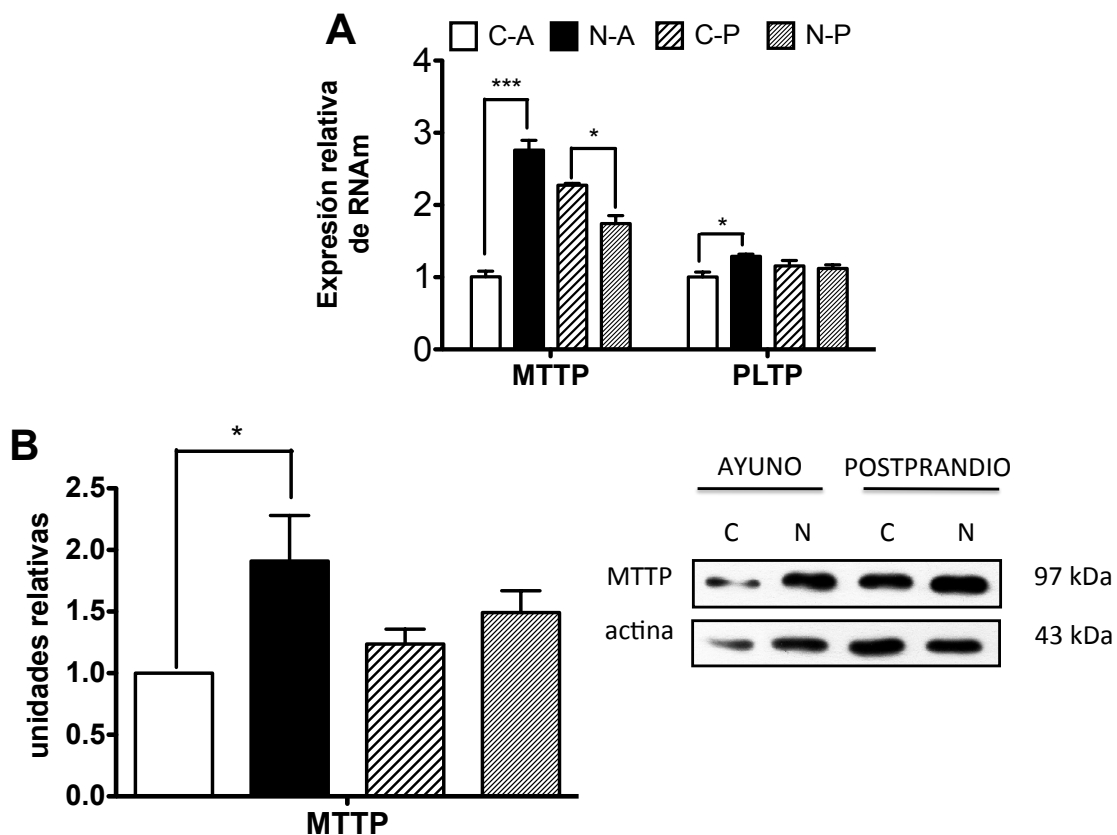


Figura 25. Expresión de enzimas involucradas en empaquetamiento de lipoproteínas en hígado. A) Expresión génica de MTTP en ayuno y postprandio, B) Cuantificación de la expresión de proteína MTTP en ayuno y postprandio e inmunoblot representativo. Promedio \pm EE, n=5-6 por grupo. * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$. C-A: Control ayuno, N-A: Nopal ayuno, C-P: Control postprandio, N-P: Nopal postprandio

B.4. Señalización de insulina

En función de las diferencias observadas en los niveles de insulina postprandial y dado que uno de los objetivos de este trabajo era determinar si había una mejora en la señalización de insulina, se determinó por western blot la fosforilación de dos proteínas involucradas en la cascada de señalización de insulina; pIRS y Akt. IRS debe estar fosforilada en tirosina 941 para que la señal de la insulina se lleve a cabo y se pueda dar el paso de fosforilación de Akt.

B.4.1. Fosforilación de IRS1 y Akt

La relación pIRS/IRS1 total y pAkt/Akt total en ayuno no presentó diferencias entre las dietas (Figura 26). Esto era esperable pues en ayuno la cascada de señalización de insulina no se encuentra prendida. En postprandio, por el contrario, se observa que la relación tanto de pIRS como de pAKT en función de sus totales se encuentra significativamente aumentada en el grupo alimentado con nopal en comparación con el control. Los resultados anteriores sugieren una mejora en la señalización de insulina en el grupo alimentado con nopal en comparación con el control.

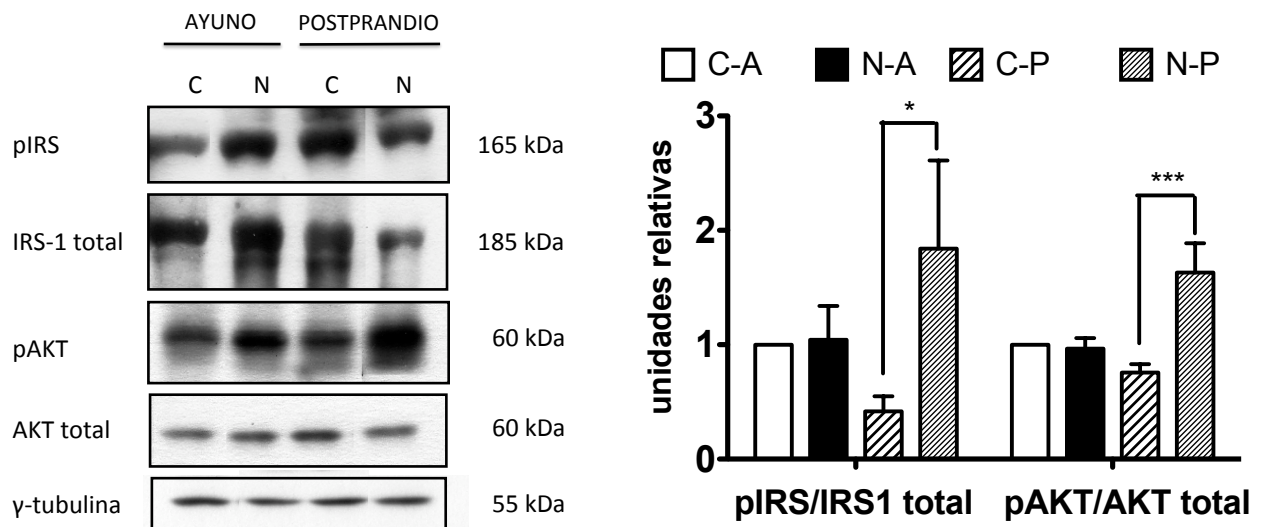


Figura 26. Relación de proteína pAkt/Akt total y pIRS/IRS1 total en hígado evaluado por western blot. Inmuno blot representativo y cuantificación del mismo. Promedio \pm EE, n=5-6 por grupo. *P<0.05, ***P<0.0001. C-A: Control ayuno, N-A: Nopal ayuno, C-P: Control postprandio, N-P: Nopal postprandio

C. Estudio del consumo de nopal sobre la absorción de lípidos a nivel intestinal en la rata Zucker (*fa/fa*): relación con la esteatosis hepática.

Uno de los hallazgos en el estudio crónico 1, fue que a las 2 h de postprandio la ratas alimentadas con nopal mostraron niveles de triglicéridos en suero significativamente mas altos que las ratas control. Con el objetivo de determinar si el consumo de nopal modificaba la cinética de absorción de lípidos a nivel intestinal y esto estuviera potencialmente se relacionado con la disminución observada en la esteatosis hepática, se evaluó la absorción de lípidos tanto en un modelo agudo como en el modelo crónico.

C.1. Estudio agudo 1.

C.1.1. Curva de absorción de lípidos

En el estudio agudo, se evaluó en las ratas Zucker (*fa/fa*) sin ningún tratamiento previo, cómo un bolo de celulosa o nopal modificaba la absorción intestinal de lípidos. Tanto la celulosa como el nopal disminuyen los triglicéridos séricos ($P=0.01$) después de la administración del bolo de aceite y en comparación con la administración del bolo sin la adición de ningún tipo de fibra, sin embargo no se encontraron diferencias entre los dos tipos de fibra; nopal vs celulosa (Figura 27).

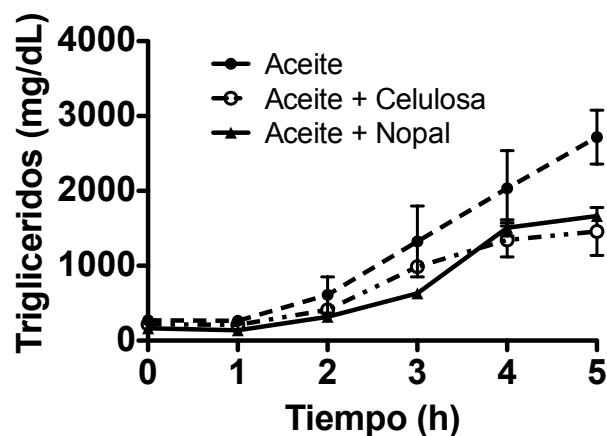


Figura 27. Curva de absorción de lípidos. Valores de triglicéridos en suero durante la prueba de absorción de lípidos. Promedio \pm EE, $n=2-3$ por grupo.

C.2. Estudio crónico 2.

En el estudio crónico 2, se repitió la intervención dietaria realizada en el estudio crónico 1, pero con el objetivo de evaluar si después de 7 semanas de alimentación con la respectivas dietas se modificaba la absorción de lípidos después de un bolo de aceite.

C.2.1. Ingesta de alimento, peso corporal y peso de tejidos

Al igual que en el primer estudio no se observaron diferencias entre las dietas en la ganancia de peso o la ingesta de alimento. La fluctuación observada en el día 49 de la ingesta de alimento se debe a que durante esa noche las ratas se colocaron en ayuno para poder realizar la primera curva de lípidos (Figura 28).

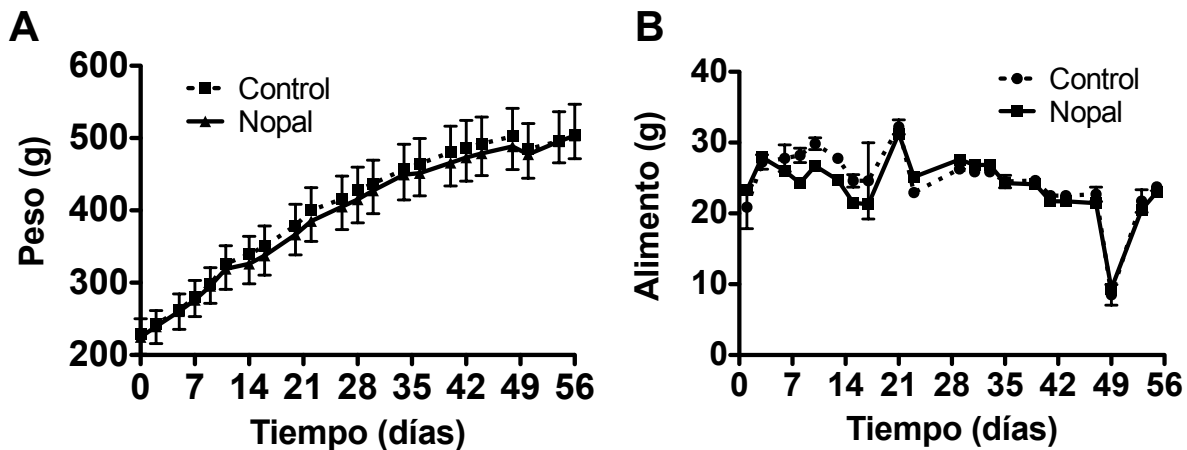


Figura 28. Peso de corporal e ingesta de alimento. A) Peso corporal de los grupos durante las 8 semanas de estudio, B) Ingesta de alimento por día durante el periodo de estudio. Valores promedio \pm EE, n=5 por grupo.

De acuerdo con el estudio crónico 1, las ratas alimentadas con nopal mostraron una disminución significativa en el peso relativo de los hígados (peso del hígado/peso corporal) ($p < 0.05$) con respecto a las ratas controles (Figura 29A). Específicamente el grupo alimentado con nopal presentó una reducción del 28% en el peso relativo del hígado respecto al control.

Adicionalmente al peso de los hígados, se midió la cantidad de tejido adiposo pues era un parámetro que no se había medido en el estudio anterior. No se observaron diferencias significativas en el peso relativo de los compartimentos de tejido adiposo visceral (epiplón, mesentérico, retroperitoneal y epididimal) entre las diferentes dietas (Figura 29B). En contraste el grupo alimentado con nopal presentó un incremento significativo ($P < 0.01$) en la cantidad de

tejido adiposo subcutáneo. Consecuentemente en el grupo alimentado con nopal se observó un incremento significativo (9.7%) en el porcentaje total de tejido adiposo en función del peso corporal.

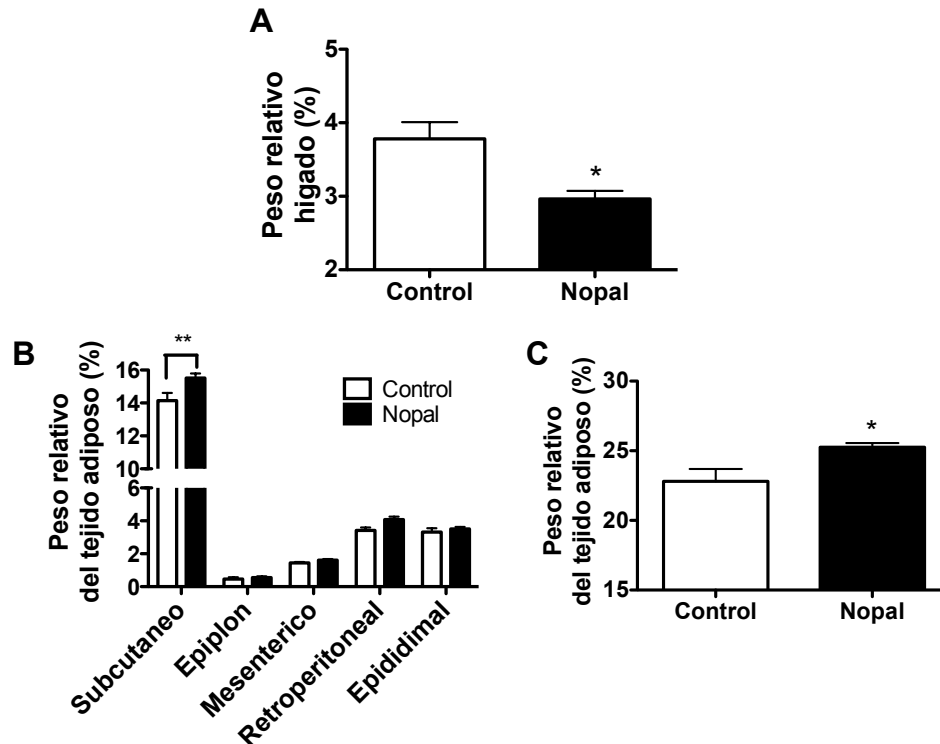


Figura 29. Peso de hígados y de los diferentes compartimentos del tejido adiposo en función del peso corporal. A) Peso relativo del hígado, B) Peso relativo de los diferentes compartimentos de tejido adiposo, C) Porcentaje de tejido adiposo en función del peso corporal (suma de los diferentes compartimentos). Valores promedio \pm EE, n=5 por grupo. *P<0.05, **P<0.01.

C.2.2. Parámetros bioquímicos

Los parámetros bioquímicos evaluados en este estudio fueron los triglicéridos séricos durante la curva de absorción de lípidos y los valores de insulina en los puntos basales de la curva.

C.2.2.1. Curvas de lípidos

Se realizaron dos curvas de lípidos; la primera tuvo como objetivo determinar si había diferencias en la depuración de lipoproteínas después de un bolo de lípidos y la segunda fue para evaluar la cinética de absorción de lípidos. Para esta última, previo a la administración del bolo de aceite se inyectó a las ratas un inhibidor de la lipasa de lipoproteínas (P-407), para

evitar la captura de triglicéridos por los tejidos y por lo tanto evaluar el incremento en los valores de triglicéridos en suero, provenientes únicamente de la absorción de lípidos.

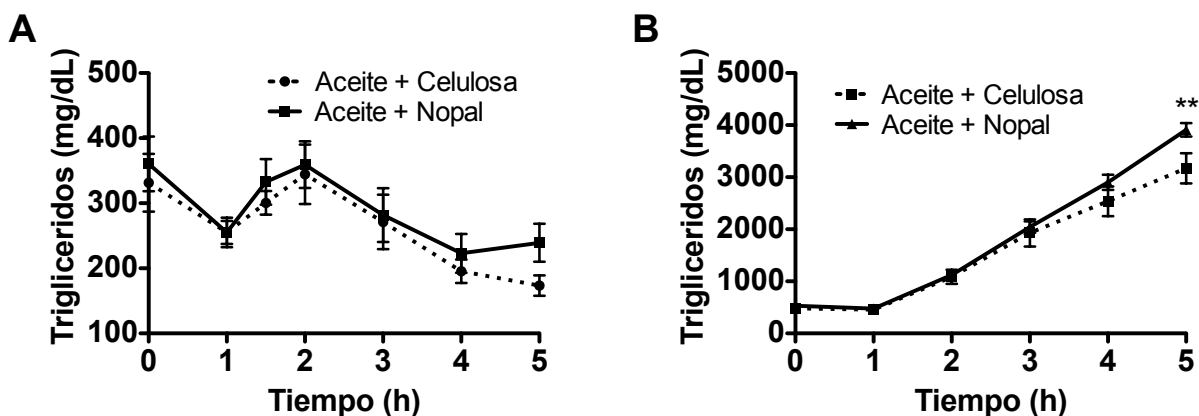


Figura 30. Curvas de absorción de lípidos. A) Concentración de triglicéridos en suero después del bolo de lípidos, B) Concentración de triglicéridos en suero después del bolo de lípidos con inhibición de la lipasa de lipoproteínas. Valores promedio \pm EE, n=4-5 por grupo. **P<0.001.

Las ratas administradas con el bolo de nopal o celulosa previo al bolo de aceite mostraron un perfil de triglicéridos muy similar a lo largo de las 5 h de duración de la curva (Figura 30A).

Durante la curva con el inhibidor de la lipasa de lipoproteínas (Figura 30B), la absorción de lípidos fue muy similar entre el bolo de celulosa y el de nopal y solo se observó una diferencia significativa en la hora cinco ($P<0.01$), donde pareciera que la presencia de nopal promueve una mayor absorción de lípidos.

C.2.2.2. Insulina

En el estudio crónico 1, la diferencia en los valores de insulina en ayuno, entre la dieta control y la dieta con nopal no alcanzó significancia por el tipo de análisis (ANOVA de 2 vías). Considerando lo anterior, así como las mejoras observadas en la fosforilación de proteínas involucradas en la cascada de señalización de insulina, en este nuevo estudio se determinaron los valores de insulina sérica en ayuno (muestras basales de la curva de lípidos). El grupo alimentado con nopal presentó valores de insulina 50% por debajo de los valores del grupo control (Figura 31).

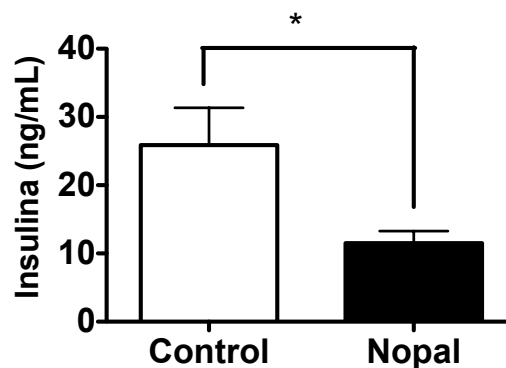


Figura 31. Valores de insulina en plasma de ratas en ayuno (muestras basales de la curva de lípidos). Valores promedio \pm EE, n=4-5 por grupo. *P<0.05.

D. Efecto del consumo de nopal sobre el desarrollo de adiposidad y la fisiología gastrointestinal en ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa. Estudio crónico 3.

Los resultados anteriores muestran un efecto claro del consumo de nopal en un modelo genético de obesidad y esteatosis hepática la rata Zucker (*fa/fa*). Sin embargo, para ampliar los conocimientos sobre los efectos del consumo de nopal hacia un modelo mas fisiológico se realizó un nuevo estudio en ratas Sprague-Dawley. En este estudio las ratas se alimentaron con una dieta control o una dieta alta en grasa adicionadas con nopal, en donde se sustituyó una proporción de la celulosa por fibra de nopal, y el resto de los componentes se ajustaron para reflejar la misma cantidad de macronutrientes.

En diversos estudios se ha demostrado que el intestino tiene un papel primario en el desarrollo de obesidad y esteatosis hepática no alcohólica (81). Considerando que uno de los componentes bioactivos del nopal es su alto contenido de polisacáridos, se realizó este estudio para determinar si el consumo de nopal modificaba las anomalías presentes en intestino inducidas por una dieta alta en grasa así como el desarrollo de adiposidad.

D.1. Ingesta de alimento y ganancia de peso

De manera similar a los resultados obtenidos en la rata Zucker, el consumo de nopal no modificó la ganancia de peso, ni la ingesta calórica (Figura 32).

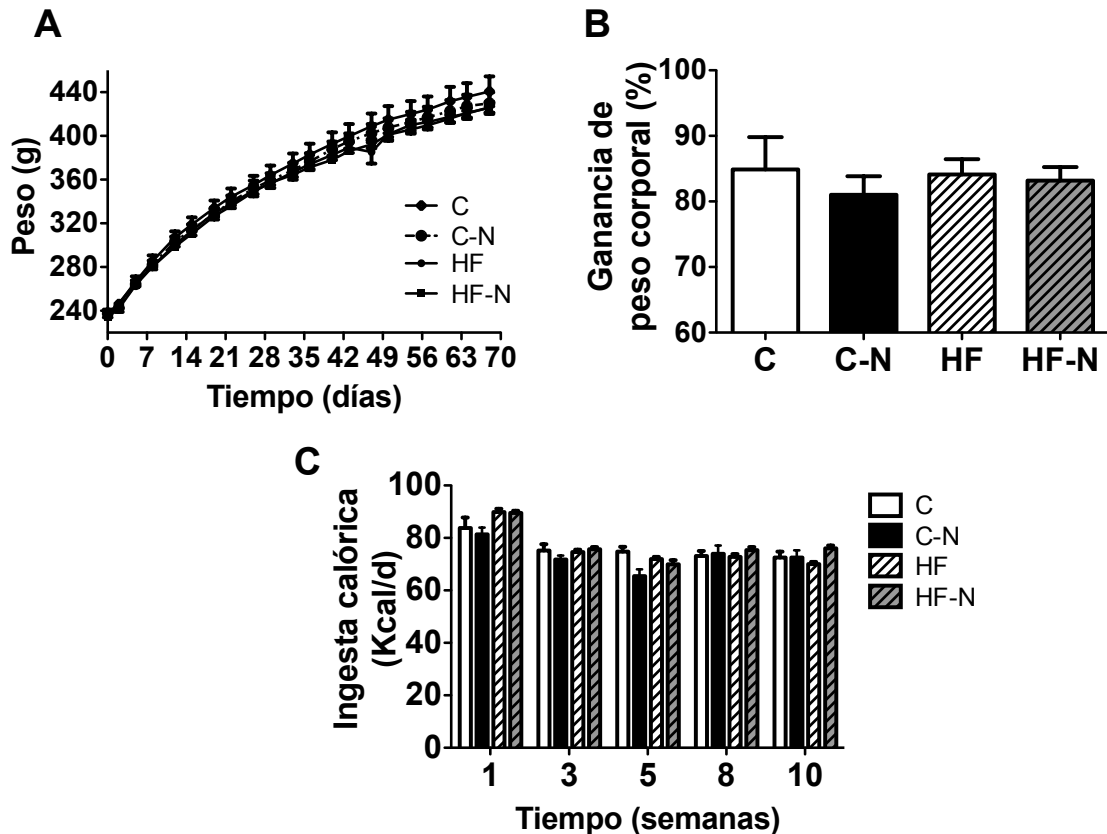


Figura 32. Peso de corporal e ingesta de alimento. A) Peso corporal de los grupos durante las 10 semanas de estudio, B) Ganancia de peso durante el estudio en función del peso corporal, C) Ingesta calórica por día durante el periodo de estudio. Valores promedio \pm EE, n=5-16 por grupo.

D.2. Adiposidad y parámetros asociados

Diversos estudios han descrito que la hipertrofia de los adipocitos, está íntimamente asociada a las funciones del adipocito y a las alteraciones metabólicas observadas en obesidad (116). De esta manera y considerando que uno de los objetivos del estudio era evaluar los efectos del consumo de nopal sobre el desarrollo de adiposidad, se determinó la adiposidad (peso del tejido adiposo/ peso corporal) y el área media de los adipocitos.

D.2.1. Peso relativo de los diferentes compartimentos

No se observaron diferencias en la adiposidad entre el grupo C y el grupo C-N; sin embargo, en las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, el grupo HF-N presentó valores de adiposidad significativamente menores que el grupo HF (Figura 33). Adicionalmente, se observó

que las diferencias en adiposidad entre estos grupos fueron resultado de diferencias significativas en el peso relativo del tejido adiposo epididimal, retroperitoneal y subcutáneo; sin embargo, no se observaron diferencias entre los grupos en el tejido adiposo mesentérico (Figura 33B).

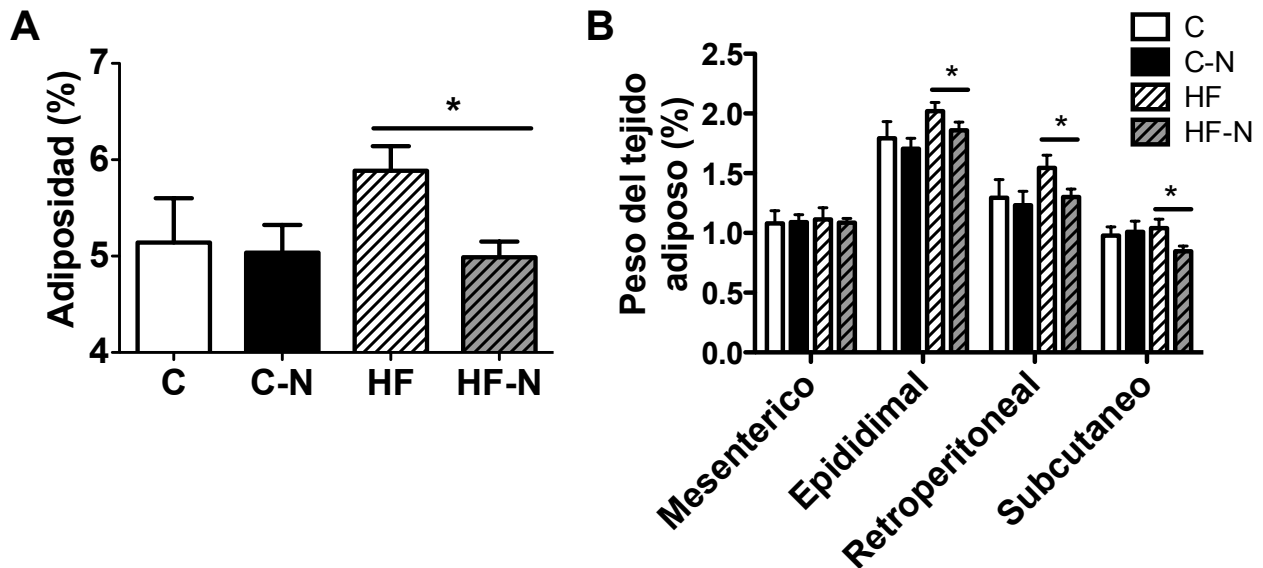


Figura 33. Peso relativo del tejido adiposo blanco. A) Adiposidad; peso total del tejido adiposo sobre el peso corporal, B) Peso relativo de los diferentes compartimentos de tejido adiposo. Valores promedio \pm EE. n=5-16 por grupo. *P<0.05.

D.2.2. Área media de los adipocitos (Subcutáneo y mesentérico)

En diversos estudios se ha demostrado que la hipertrofia de los adipocitos correlaciona con el grado de inflamación en los diferente compartimentos (117). De esta manera se midió el área media de los adipocitos en muestras de tejido adiposo mesentérico y subcutáneo.

Acorde a lo descrito previamente (88), el área media de los adipocitos del tejido adiposo mesentérico fue significativamente menor que el área media de los adipocitos subcutáneos para todos los grupos (P<0.0001). Sin embargo, en el tejido adiposo mesentérico no se observaron diferencias entre los grupos con dieta control y dieta alta en grasa o por la presencia de nopal.

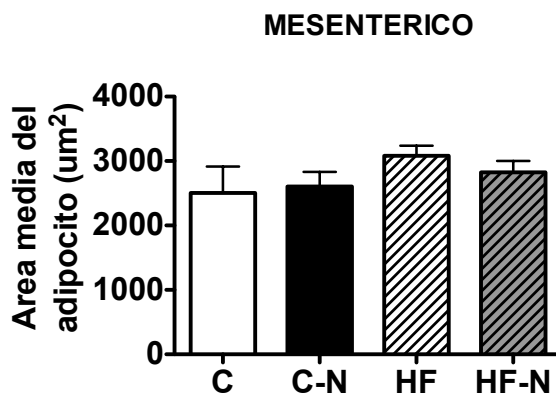
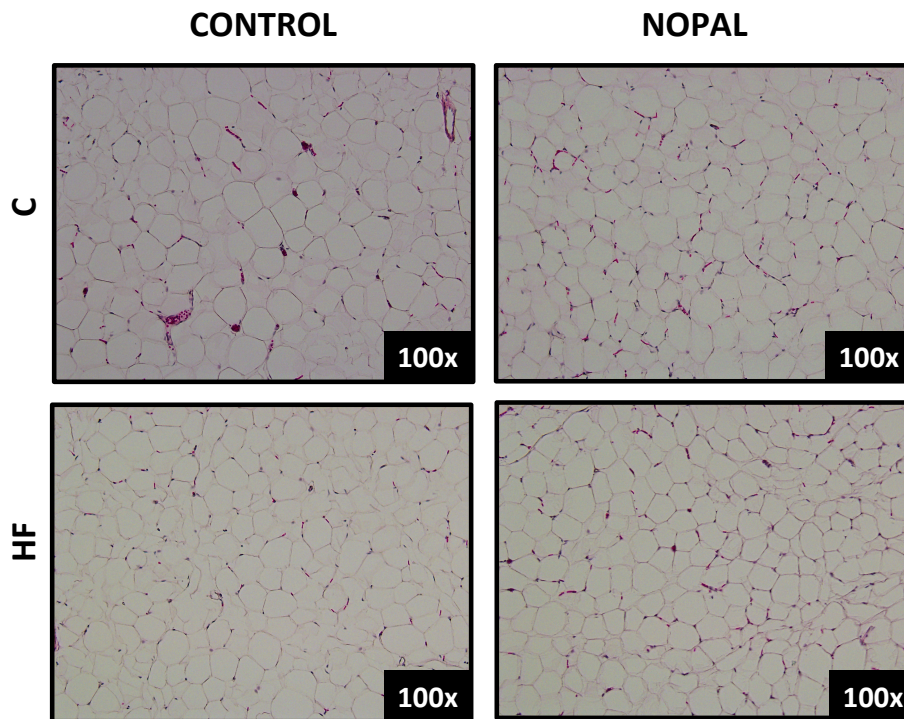


Figura 34. Análisis histológico de secciones de tejido adiposo mesentérico y cuantificación del área media del adipocito, promedio \pm EE. n= 5-12 por grupo.

En cuanto al tejido adiposo subcutáneo, como se puede observar en las histologías (Figura 35), con la dieta control no se observaron diferencias entre el grupo C y el C-N, sin embargo con la dieta alta en grasa, el grupo HF-N presentó un área media significativamente menor que el grupo HF ($P < 0.05$), lo que podría sugerir que el consumo de nopal con una dieta alta en grasa de alguna manera previene la hipertrofia del adipocito.

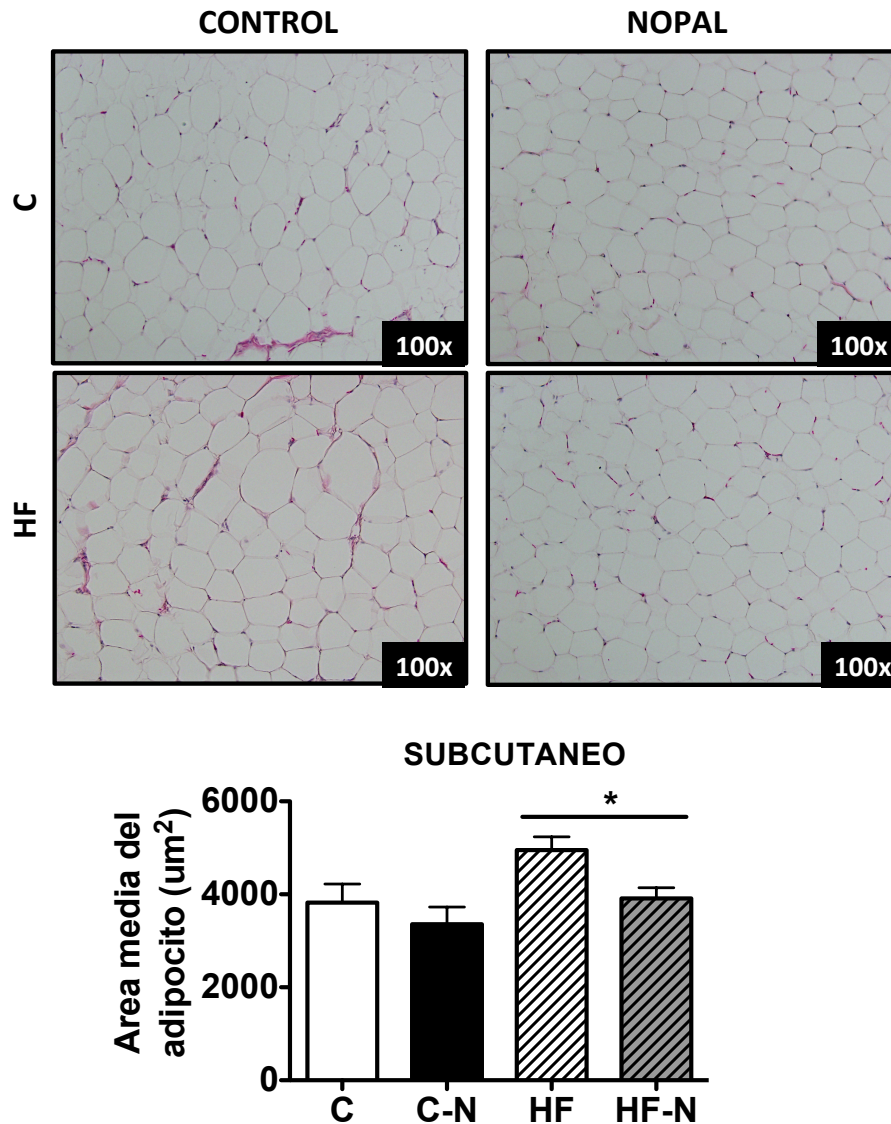


Figura 35. Análisis histológico de secciones de tejido adiposo subcutáneo y cuantificación del área media del adipocito, promedio \pm EE. $n = 5-12$ por grupo. $*P < 0.05$.

D.3. Parámetros bioquímicos en suero

D.3.1. Glucosa, triglicéridos y colesterol

Los valores de glucosa en suero están dentro de los rangos normales (< 156 mg/dL) (115) y aunque se observa una ligera tendencia en los grupos alimentados con nopal (C-N y HF-N) hacia menores valores de glucosa en comparación con el grupo C y HF, estas diferencias no son significativas (Figura 36A).

En cuanto a los valores de triglicéridos en suero, todos los grupos presentaron concentraciones dentro de los rangos normales y no se observó un efecto claro de la adición de nopal ya sea con una dieta control o con una dieta alta en grasa. Las ratas alimentadas con la dieta C-N presentaron valores significativamente mayores que las ratas HF.

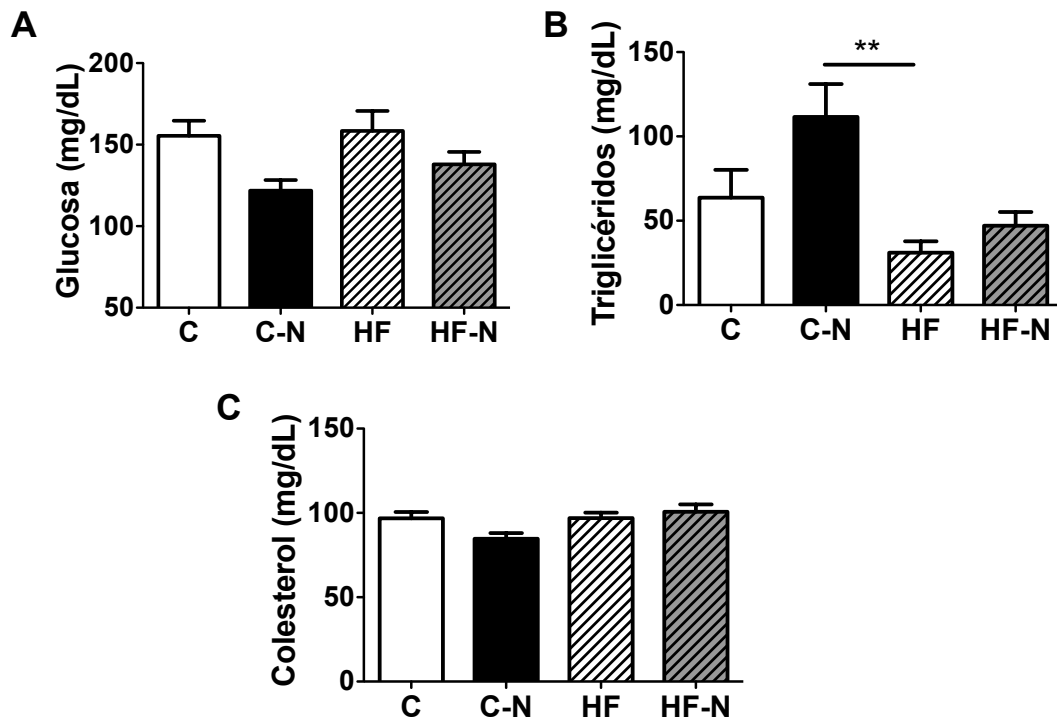


Figura 36. Valores de glucosa, triglicéridos y colesterol en suero. A) Concentración de glucosa en suero, B) Concentración de triglicéridos en suero, C) Concentración de Colesterol en suero. Valores promedio \pm EE. n=5-16 por grupo. **P<0.001.

En la Figura 36C se observa que no hubo diferencias entre los grupos en cuanto los niveles de colesterol en suero.

D.3.2. Adipocinas en suero

Se ha descrito que durante el desarrollo de obesidad, el crecimiento del tejido adiposo puede generar una alteración en la secreción de adipocinas, de esta manera se midió en suero la concentración de leptina y adiponectina.

En los valores de leptina en suero con la dieta control no se observaron diferencias entre el grupo C y el C-N; sin embargo, en las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, el grupo HF-N mostro valores significativamente menores que la dieta HF (Figura 37A). Acorde con

reportes previos (56) los valores de leptina en suero correlacionaron significativamente con el porcentaje de adiposidad, lo cual refuerza la relación entre el incremento de tejido adiposo y el desarrollo de hiperleptinemia (Figura 37C).

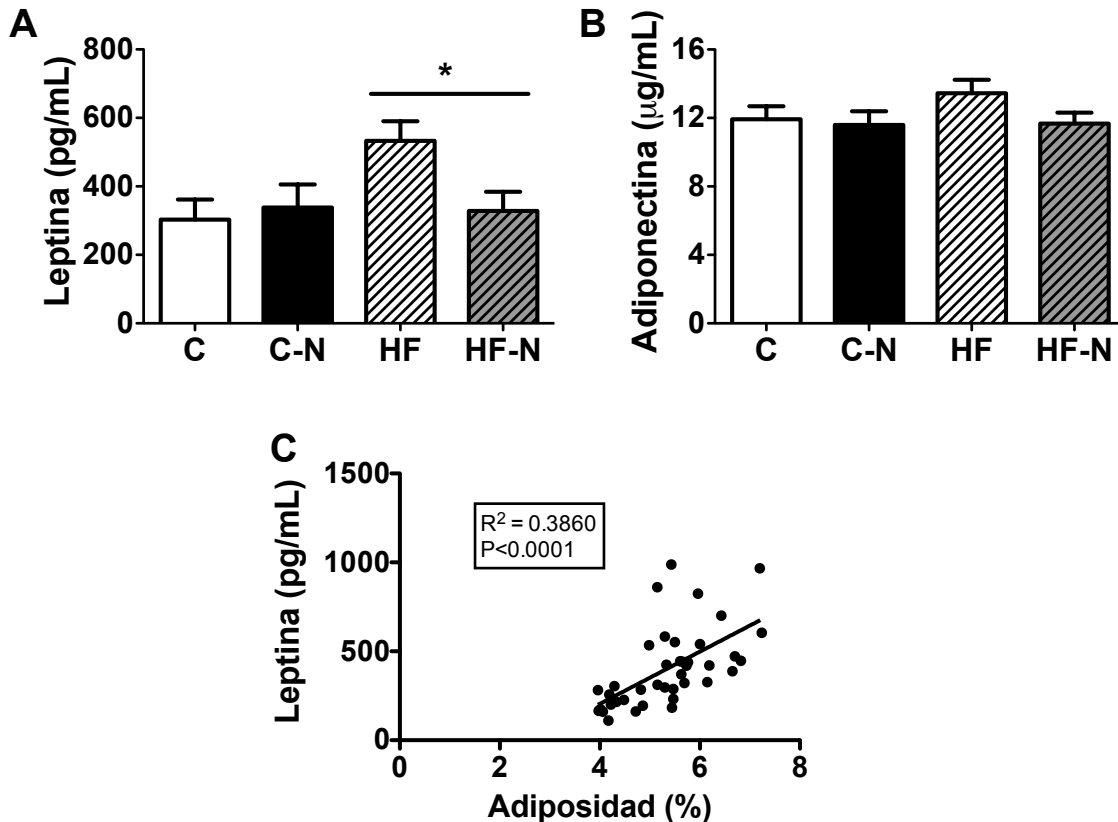


Figura 37. Valores de leptina y adiponectina total en suero de las ratas en ayuno. A) Concentración de leptina en suero, B) concentración de adiponectina en suero, C) Relación entre la adiposidad y los valores de leptina en suero. Valores promedio \pm EE. $n=5-16$, $*P<0.05$

La adiponectina, en contraste con la leptina, se considera como una adipocina benéfica. Aunque en estados de obesidad esta adipocina se ha visto disminuida, estimula la secreción de citocinas antiinflamatorias y se ha observado que puede estimular la oxidación de ácidos grasos en hígado y músculo (56). A diferencia de los resultados observados en el estudio con ratas Zucker, en este estudio no se observaron diferencias en los valores de adiponectina total entre los grupos alimentados con dieta control o alta en grasa y los grupos alimentados con nopal, respectivamente (Figura 37B).

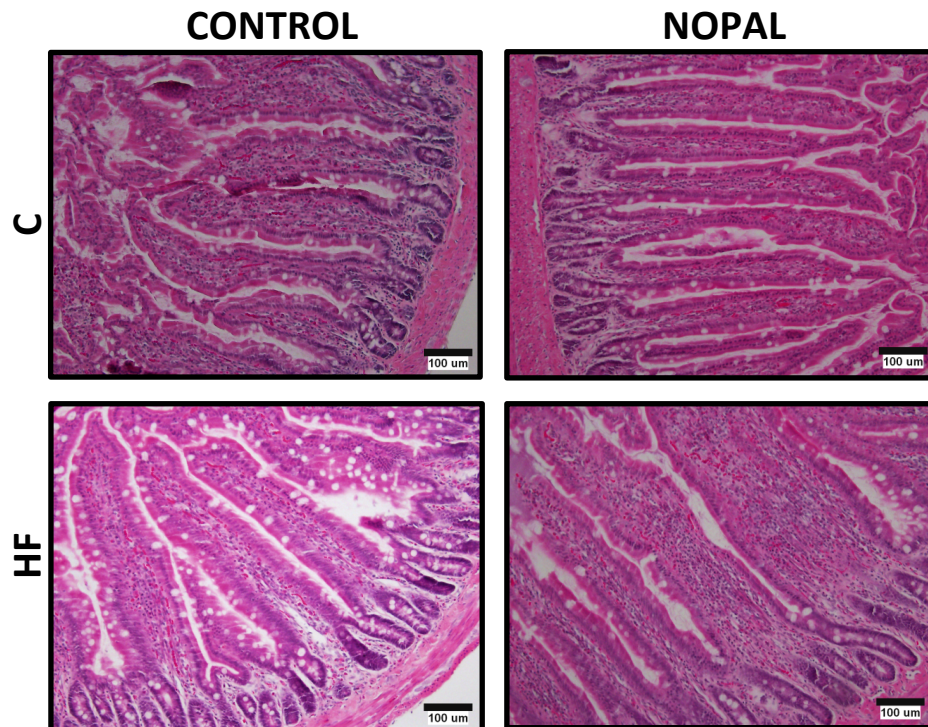
D.4. Fisiología intestinal

Existen diversos reportes que mencionan que el consumo de una dieta alta en grasa puede modificar la morfología y la funcionalidad del epitelio intestinal (86). Adicionalmente se ha observado que la concentración y el tipo de fibra dietaria también pueden modificar parámetros de la morfología y fisiología gastrointestinal (118, 119).

Considerando que cada sección del intestino tiene funciones específicas y que las alteraciones en la fisiología gastrointestinal son diferentes en cada una de estas secciones, nuestros resultados se dividieron acorde con las divisiones intestinales.

D.4.1. Yeyuno: morfología intestinal

El yeyuno se considera el principal sitio de absorción, se ha observado que la adición de fibras solubles a la dieta puede alterar la morfología de las vellosidades (120). Es por esto que en las histologías de yeyuno se midió el largo de las vellosidades para determinar si el consumo de nopal tenía algún efecto.



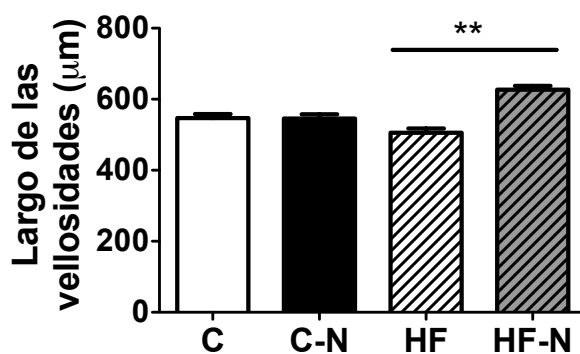


Figura 38. Histologías representativas de secciones de yeyuno y largo de las vellosidades. Valores promedio \pm EE. n = 5-8 por grupo, $P < 0.01$.

El nopal no tuvo ningún efecto sobre el largo de las vellosidades en la dieta control, sin embargo el largo de las vellosidades en la dieta alta en grasa pareciera ser ligeramente menor que las controles y con la adición de nopal este se incrementa de manera significativa (Figura 38).

D.4.2. Íleon: Permeabilidad intestinal

Diversos estudios han descrito que el consumo de dietas altas en grasa puede alterar la permeabilidad intestinal, contribuyendo al desarrollo de endotoxemia y metainflamación observado en obesidad y en NAFLD (90). Adicionalmente, algunos tipos de fibras dietarias y prebióticos mejoran las alteraciones en la permeabilidad intestinal (84), por lo que decidimos evaluar si el consumo de nopal tenía un efecto. Nuestros resultados muestran que la permeabilidad intestinal tanto trans como paracelular en el íleon, (Figura 39) no se alteró por el consumo de dietas altas en grasa y tampoco se observó un efecto por el consumo de nopal.

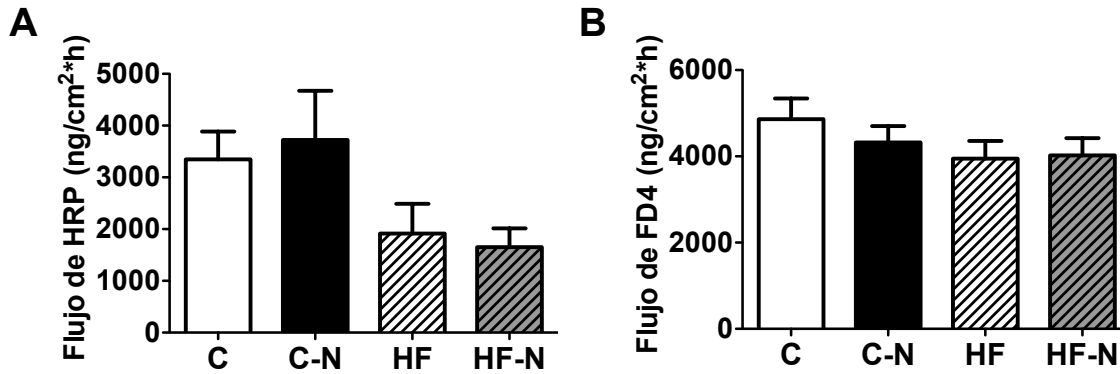


Figura 39. Evaluación de la permeabilidad intestinal en secciones de íleon. A) Medición del flujo de HRP como indicador de la permeabilidad transcelular, B) Medición del flujo de FD4 como indicador de la permeabilidad paracelular. Valores promedio \pm EE. n=5-14 por grupo.

D.4.3. Ciego

El ciego tiene una gran importancia metabólica ya que contiene la mayor concentración de bacterias intestinales, actividad metabólica y fermentación intestinal. Por esto, algunos autores se han referido a él como un bioreactor (121).

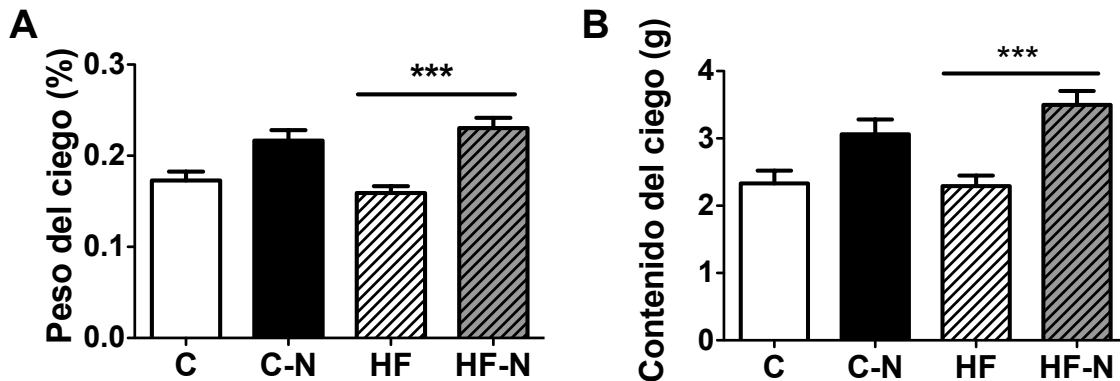


Figura 40. Peso del tejido y contenido del ciego. A) Peso relativo del ciego B) Peso del contenido del ciego. Valores promedio \pm EE. n=5-14 por grupo. ***P<0.0001.

Las ratas alimentadas con nopal presentaron un incremento tanto en el peso del tejido del ciego como del contenido intestinal en comparación con las ratas control (Figura 40). Sin embargo, este incremento solo fue significativo en las dietas altas en grasa. De manera interesante, al realizar el análisis de correlación entre las variables medidas encontramos una fuerte

correlación negativa tanto entre el peso relativo del ciego y el porcentaje de adiposidad ($P < 0.01$), como entre el peso del contenido del ciego y la adiposidad ($P < 0.0001$).

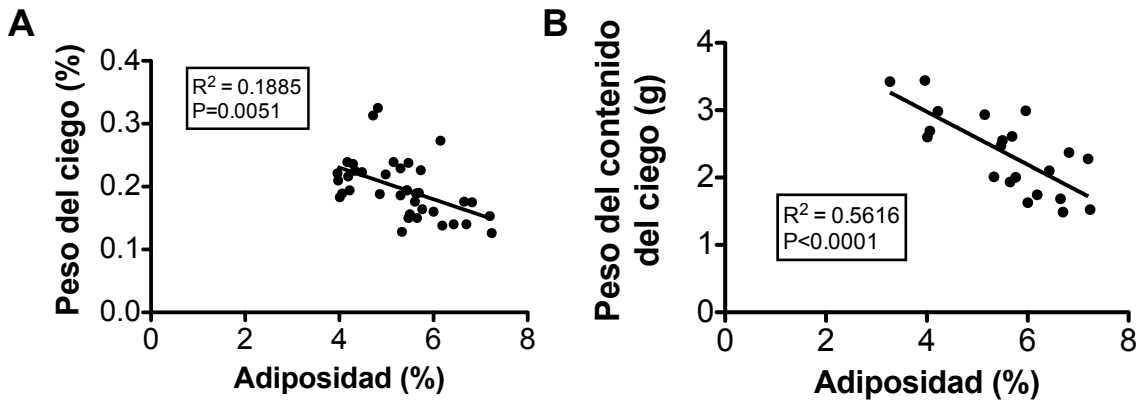


Figura 41. Correlación entre el peso del ciego y la adiposidad. A) Relación entre el peso relativo del ciego y la adiposidad B) Relación entre el peso del contenido del ciego y la adiposidad.

Considerando la asociación entre inflamación intestinal y el desarrollo de obesidad se midió la actividad de la MPO en el ciego, como marcador de la infiltración por neutrófilos. En las dietas control, no se observó efecto del consumo de nopal; sin embargo, en la dieta alta en grasa, las ratas HF-N mostraron valores de actividad significativamente menores que las ratas HF (Figura 42A). Adicionalmente se midieron las ERO, debido al papel que juegan en la inducción de las respuesta inflamatoria. El consumo de nopal tanto en las dietas control como en las dietas altas en grasa tiende a disminuir los niveles de ERO (Figura 42B).

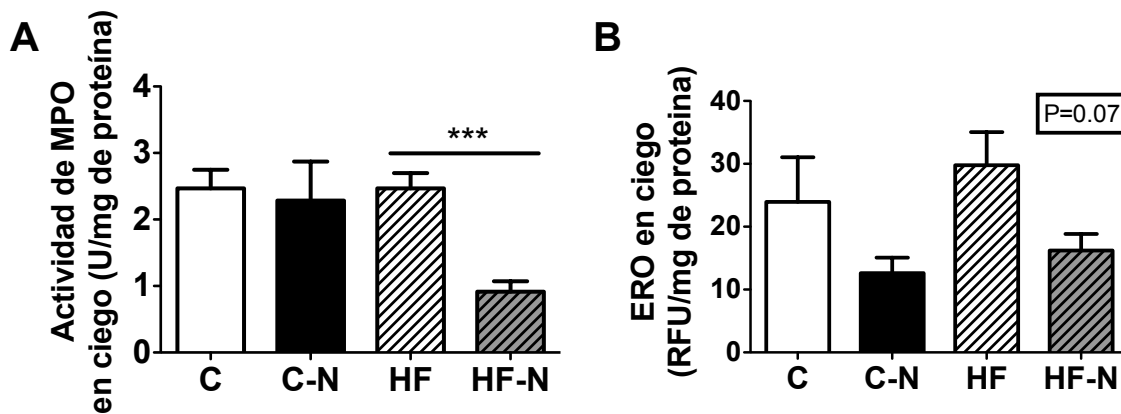


Figura 42. Efecto del consumo de nopal sobre marcadores de inflamación y especies reactivas de oxígeno en el ciego. A) Actividad de la MPO como marcador de inflamación en ciego, B) Valores de ERO en ciego. Valores promedio \pm EE, n=5-16 por grupo. ***P<0.0001.

3.4. Colon

En estudios recientes se ha demostrado que las dietas altas en grasa inducen inflamación en diversas partes del colon y esta correlaciona con la inflamación sistémica (122). La actividad de la MPO como marcador de inflamación no presentó diferencias entre las dietas (Figura 43A). En cuanto a los niveles de ERO, no se observa un efecto claro de la dieta alta en grasa pero si se observa un efecto del consumo de nopal. En la dieta alta en grasa la adición de nopal produjo una disminución significativa en las ERO (P<0.05). En las dietas control se observa una tendencia similar aunque no alcanzó significancia.

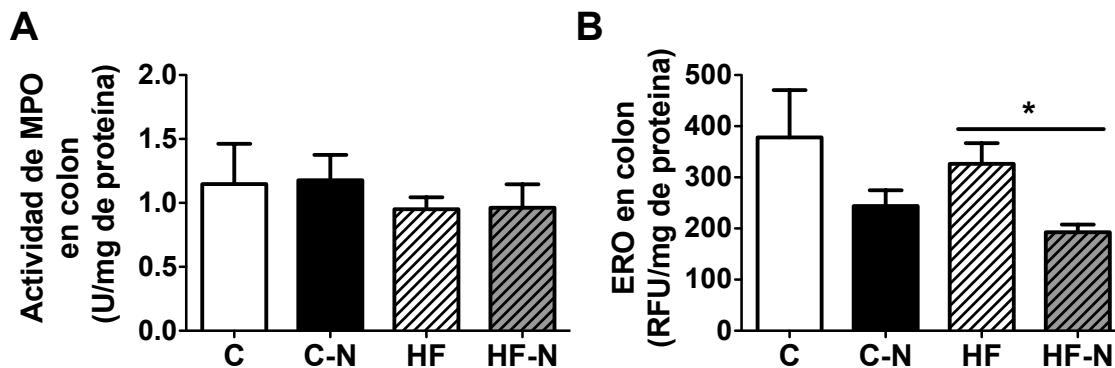


Figura 43. Efecto del consumo de nopal sobre marcadores de inflamación y especies reactivas de oxígeno en el colon. A) Actividad de la MPO como marcador de inflamación en colon, B) Valores de ERO en el colon. Valores promedio \pm EE. n=5-16 por grupo, *P<0.05.

DISCUSION

La esteatosis hepática no alcohólica, es actualmente la enfermedad hepática crónica más común en el mundo occidental (123). Esta enfermedad comprende desde el punto de vista histopatológico un espectro que varía entre el simple depósito de grasa en el hígado (esteatosis) hasta la esteatohepatitis, fibrosis y cirrosis (51). Estudios epidemiológicos han demostrado que la presencia de obesidad y síndrome metabólico son un factor de riesgo importante para el desarrollo de la esteatosis e incluso algunos autores sugieren que la esteatosis hepática es el componente hepático del síndrome metabólico (124).

Dado que actualmente no existen tratamientos farmacológicos específicos para el tratamiento y evolución de la esteatosis hepática no alcohólica, se ha definido como la mejor estrategia los cambios en el estilo de vida, tales como actividad física y disminución de peso entre otras. Es importante mencionar que la dificultad para lograr estos cambios ha hecho necesaria la búsqueda de estrategias dietarias. Diversos autores han demostrado una mejora en parámetros de la esteatosis hepática con el uso de diferentes fuentes de proteína, extractos de té verde y betaína entre otros; sin embargo, estos alimentos no siempre son disponibles o de fácil acceso a una población.

El nopal ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional para el control de algunas enfermedades como la diabetes; sin embargo, aún no se ha demostrado de manera científica la eficacia, ni los mecanismos de acción de esta cactácea, probablemente porque México es el único país que lo utiliza para consumo humano. El nopal es un alimento de fácil acceso para toda la población y es parte de la cocina mexicana. Estudios recientes en el Departamento de Fisiología de la Nutrición, han demostrado que el consumo de nopal puede disminuir significativamente los picos postprandiales de glucosa e insulina, las concentraciones del péptido gastrointestinal GIP y aumentar la actividad antioxidante en pacientes con diabetes tipo 2 (21).

El presente trabajo describe algunos de los efectos del consumo de nopal, como alimento tradicional, tratando de abordar los posibles mecanismos de acción a nivel molecular y su potencial para ser utilizado como parte de estrategias dietarias para controlar algunas enfermedades relacionadas con la nutrición.

Dado que no se puede disponer tan fácilmente de muestras de tejidos, como hígado y tejido adiposo, de pacientes con afecciones metabólicas, los modelos animales de obesidad o diabetes, son de gran utilidad para estudiar el mecanismo de acción del nopal a largo plazo.

En el presente trabajo se utilizó un modelo genético de obesidad la rata Zucker (*fa/fa*) con el objeto de estudiar si el consumo a largo plazo podía mejorar la hiperinsulinemia. Los primeros hallazgos revelaron que el consumo de nopal disminuye la hiperinsulinemia, sin embargo de manera interesante, se encontró que su consumo tiene un efecto adicional tanto en la disminución del peso del hígado como en la acumulación de lípidos en hígado y los marcadores de daño hepático. De esta manera, se procedió a estudiar el o los posibles mecanismos de acción por el cual el nopal mejora la esteatosis hepática.

Una de las primeras vías de estudio fue determinar el mecanismo por el cual se encontraba una disminución en el contenido de triglicéridos hepáticos en los grupos alimentados con nopal. Para esto, se evaluó la expresión del ARN mensajero y la abundancia de proteína de diferentes proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos. Esto es, debido a que en términos cinéticos la acumulación de lípidos en hígado responde a un desequilibrio entre la captación, la síntesis, la salida y la oxidación de los ácidos grasos (65). De hecho, en diversos modelos animales de esteatosis hepática, se ha descrito que este desequilibrio es el resultado de alteraciones en la regulación de alguna de estas vías.

En cuanto a la captura de ácidos grasos, se ha descrito que las ratas Zucker obesas tienen incrementada la expresión del transportador CD36, uno de los transportadores que internaliza los ácidos grasos al interior del hepatocito (102). Por lo anterior podría pensarse que una mayor captura de ácidos grasos contribuye a la acumulación de triglicéridos en hígado. Adicionalmente, se ha documentado que en obesidad y resistencia a la insulina la liberación de ácidos grasos provenientes del tejido adiposo (lipólisis) se encuentra desregulada, provocando un mayor flujo de ácidos grasos hacia el hígado, que muchas veces no se suprime en el estado postprandial. Los resultados de nuestro estudio muestran que el consumo de nopal no modificó los niveles de ácidos grasos en suero, ni la expresión de este transportador, sugiriendo que no hay una modificación en el flujo de ácidos grasos o en la captura de los mismos por el hígado.

La segunda vía que se analizó fue la lipogénesis. Aunque de manera general la acumulación de lípidos en hígado resulta principalmente de los ácidos grasos provenientes de la lipólisis, algunos estudios han demostrado que el incremento en la lipogénesis también puede contribuir a esta acumulación (53, 125). En las ratas alimentadas con nopal, a pesar de que la expresión de los genes involucrados en lipogénesis está incrementada en el postprandio, la fosforilación de ACC, la forma inactiva de esta proteína, también lo está. Tomando en cuenta lo anterior, y

aunado a que la cantidad de proteína de FAS no mostró cambios significativos, es posible sugerir que el consumo de nopal no tiene un efecto claro en la regulación de la lipogénesis.

La tercera vía analizada fue la exportación de triglicéridos del hígado, que ocurre principalmente a través de la secreción de VLDLs. En algunos modelos de esteatosis hepática, comúnmente se observa hipertrigliceridemia, debido a que la exportación de triglicéridos del hígado es insuficiente, resultando en la acumulación de lípidos (46). Adicionalmente, se han descrito alteraciones en la formación de VLDLs, como consecuencia de un incremento en la degradación de ApoB o bien por una desregulación de las enzimas que empaquetan a los triglicéridos en las VLDLs (67). Tal es el caso de la MTTP, la proteína responsable del empaquetamiento de triglicéridos a VLDLs. Los resultados del presente trabajo, muestran un incremento en la expresión tanto génica, como de la proteína total de MTTP, y una mayor expresión génica de PLTP, la proteína que transfiere los fosfolípidos a las VLDL nacientes. Estos hallazgos sugieren que el empaquetamiento de VLDLs en el grupo alimentado con nopal se encuentra aumentado en ayuno. El análisis de lipoproteínas en suero, reveló que las partículas ricas en triglicéridos, VLDLs, también estaban incrementadas en el grupo alimentado con nopal, lo cual posiblemente implica que el consumo de nopal no sólo aumentó el empaquetamiento, si no también la secreción de estas partículas. En conjunto estos resultados indican que el aumento en las VLDLs, podría estar asociado a la menor acumulación de lípidos en el hígado de estas ratas.

Finalmente, la cuarta vía analizada fue la oxidación de ácidos grasos. Aunque en esteatosis hepática comúnmente se observa una mayor entrada de ácidos grasos, se ha descrito que la oxidación está disminuida por defectos en la activación de PPAR α o por la disfunción mitocondrial (45, 47). Uno de los factores clave en la regulación de la oxidación es el factor de transcripción PPAR α . Adicionalmente, la oxidación mitocondrial está regulada por CPT1 y a nivel de actividad, por la concentración de malonil CoA, el producto de la ACC. En el presente trabajo se observó, en la ratas alimentadas con nopal, un incremento en la expresión del mensajero de PPAR α y su genes blanco CPT1 y ACOX, esta última, una proteína que está involucrada en la oxidación peroxisomal. Estos resultados podrían sugerir un aumento en la oxidación mitocondrial y peroxisomal regulada por PPAR α , en el grupo alimentado con nopal. Adicionalmente, la tendencia observada en la fosforilación de ACC apoya esta vía. De esta manera, aunque las ratas alimentadas con nopal presentan una mayor expresión de SREBP-1,

en postprandio, se podría sugerir que probablemente la oxidación es mayor que la lipogénesis y por eso se presenta una disminución en el acúmulo de lípidos en el hígado.

En cuanto a los cuerpos cetónicos, si bien no observamos diferencias en la concentración de β -hidroxibutirato entre las dietas, esto no necesariamente indica que no hay mayor oxidación. Una posible explicación es que los cuerpos cetónicos se producen posterior a una saturación del ciclo de Krebs, en donde el producto de la beta oxidación (acetil CoA) no puede entrar a este ciclo desviándose hacia la producción de cuerpos cetónicos (126). Sin embargo, si el ciclo de Krebs no se satura, la acetil CoA producida en la beta oxidación, podrá entrar para producir ATP y CO_2 , sin incrementarse la producción de cuerpos cetónicos.

En resumen, en cuanto al metabolismo de lípidos, el consumo de nopal parece no modificar ni la captura, ni la síntesis de ácidos grasos en el hígado. En contraste, pareciera que tanto la exportación de los ácidos grasos a través de las partículas ricas en triglicéridos (VLDL), como la oxidación de los mismos, está incrementada. Esto podría resultar en una mayor eliminación de ácidos grasos, explicando así la menor acumulación de triglicéridos en los hígados de las ratas alimentadas con nopal.

Algunas de las posibles explicaciones por las cuales el consumo de nopal modifica el metabolismo de lípidos podrían incluir los siguientes mecanismos:

- La adiponectina. Esta hormona antiinflamatoria es secretada por el tejido adiposo y puede activar la oxidación de ácidos grasos en músculo e hígado. Se sabe que las concentraciones de adiponectina correlacionan inversamente con la cantidad de tejido adiposo y están disminuidas en obesidad, diabetes tipo 2 y esteatosis hepática (55, 58).

Los resultados mostraron un aumento en la expresión del mensajero de $\text{PPAR}\alpha$ y sus genes blanco CPT-1 y AOX. En paralelo, se observó que las concentraciones de adiponectina en las ratas alimentadas con nopal en suero incrementaron significativamente. En conjunto, estos resultados podrían sugerir una asociación en donde es posible que la activación de la vía oxidativa a través de $\text{PPAR}\alpha$, sea consecuencia del incremento en los valores de adiponectina. De hecho en diversos estudios en modelos animales se ha observado que tanto la administración de adiponectina como la sobreexpresión de su receptor, AdipoR2 en hígado, es capaz de mejorar la esteatosis hepática y su evolución (54, 59).

- Insulina y señalización de insulina: La presencia de NAFLD esta asociada fuertemente tanto a la resistencia a la insulina periférica como hepática. Aunque aún se desconoce si la resistencia

a la insulina es una causa o consecuencia de la esteatosis, en intervenciones para mejorar la resistencia a la insulina comúnmente se ha observado una mejora en la acumulación de lípidos en hígado (51).

En las ratas Zucker alimentadas con nopal no se observó una mejora en las curvas de tolerancia a la glucosa o en el índice HOMA-IR en comparación con las control. Lo anterior sugiere que no hubo una mejora en la resistencia periférica a la insulina. Sin embargo, estas ratas presentaron menor hiperinsulinemia postprandial que el grupo control y no hubo diferencias en los niveles de glucosa postprandiales. De esta manera, es posible sugerir, que aunque las dietas contienen la misma cantidad de carbohidratos disponibles, posiblemente el nopal o el tipo de fibra dietaria que contiene, modifique los procesos de absorción intestinal de glucosa, de tal manera que esto resulte en una menor estimulación de la secreción de insulina. Por otro lado, una explicación interesante por la cual los menores valores de insulina podrían contribuir a la menor acumulación de lípidos en hígado es a través de Foxa2. Se ha descrito que aun en la resistencia a la insulina, Foxa2, un factor que estimula la oxidación de ácidos grasos y es inactivado por insulina, permanece sensible a los efectos de esta hormona. En esteatosis hepática esto posiblemente contribuye a la acumulación de triglicéridos en hígado (50). Por los hechos anteriores, es posible especular que la disminución en los valores de insulina en ayuno podría estar asociada al incremento en la oxidación.

Adicionalmente, las modificaciones en los valores de insulina nos llevaron a examinar algunas de las proteínas involucradas en la señalización de insulina en hígado. Esto, con el objetivo determinar si aunado a la mejora en los valores de insulina en suero se observaban también mejoras en la señalización hepática de insulina.

Los análisis por Western blot mostraron una mayor activación (fosforilación) de IRS y Akt, en hígado en postprandio en el grupo alimentado con nopal. Estas dos proteínas son clave en la cascada de señalización de insulina, y se ha descrito que en estados de resistencia a la insulina la fosforilación de estas proteínas en residuos de tirosina se encuentra disminuida (47, 127, 128). De esta manera, a pesar de no haber cambios en la resistencia periférica a la insulina, sería válido sugerir que el nopal mejora la señalización de insulina en hígado mediada por IRS y Akt. Resultados similares se han obtenido en humanos en donde paralelamente a la disminución de lípidos en hígado se observa una disminución en la resistencia hepática a la insulina, sin observarse cambios en la resistencia periférica (50, 129).

- Estrés oxidante: Se ha descrito que el nopal contiene polifenoles, tales como quercetina, kaempferol e isorhamnetina, que en diversos estudios han mostrado tener actividad

antioxidante (3). Por otro lado múltiples estudios han descrito que el estrés oxidante contribuye de manera importante a la evolución de NAFLD (130). Las ERO producidas tanto por la oxidación mitocondrial como por las vías alternas de oxidación (peroxisomal y microsomal), contribuyen al desequilibrio en el estatus antioxidante. Adicionalmente, las ERO junto con la acumulación de triglicéridos en hígado pueden resultar en peroxidación lipídica, la cual a su vez contribuye al daño de las membranas mitocondriales incrementando entonces, la disfunción mitocondrial (60). Considerando lo anterior, se realizó la medición de diferentes marcadores para evaluar el estatus antioxidante, tanto en hígado como en suero (Los resultados se encuentran en el Anexo I). Los resultados mostraron valores mas bajos de ERO en el hígado de las ratas alimentadas con nopal en ayuno. Consecuentemente los niveles de MDA, un marcador de peroxidación lipídica, se encontraron disminuidos (Figura 1, Anexo I). De esta manera, es posible sugerir que el consumo de nopal mejorar el estatus antioxidante en el hígado de la rata Zucker.

El estrés oxidante responde a un desequilibrio redox entre las especies reactivas y las defensas antioxidantes, que puede producir daño celular por un exceso de moléculas pro-oxidantes (131). La disminución de las especies reactivas puede llevarse a cabo a través de dos mecanismos; por un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes o por la presencia de compuestos bioactivos que atrapen directamente a estas ERO.

Con el fin de determinar la causa de la disminución en las ERO en los grupos alimentados con nopal, se midió la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes en hígado. En general, la expresión y actividad de la enzimas antioxidantes no se modificó en los grupos alimentados con nopal (Tabla 1, Anexo 1), sugiriendo que el consumo de nopal no modifica la expresión y/o actividad de estas enzimas.

En la literatura se ha reportado que extractos de nopal son capaces de atrapar las ERO y así prevenir el daño celular mediado por radicales libres (132). Tomando en cuenta lo anterior, se podría especular que la atenuación en el estrés oxidante, en las ratas alimentadas con nopal, es consecuencia de una interacción directa entre las moléculas antioxidantes, presentes en el nopal, y las ERO; sin embargo, aún se requieren más estudios. De hecho diversas intervenciones dietarias, en modelos animales, han encontrado una mejora en el desarrollo de NAFLD con la administración de compuestos antioxidantes tales como resveratrol (33), tocoferol (133), y polifenoles del té verde (75). Estos estudios, atribuyen esta mejora a la disminución en el estrés oxidante ya sea por atrapamiento directo o por modulación de las defensas antioxidantes.

Por otro lado se ha descrito que el estrés oxidante juega un papel importante en la regulación de la secreción de VLDLs. La peroxidación lipídica induce la proteólisis de la ApoB 100, y el estrés oxidativo disminuye la expresión del mensajero de la MTTP, resultando en la inhibición de la secreción de las VLDLs (61). Nuestros resultados muestran un incremento significativo en la expresión de la MTTP y en la cantidad de VLDLs en suero en ayuno, lo que podría estar asociado a la mejora en el estrés oxidante.

En cuanto al estrés oxidante en suero, se midió la capacidad antioxidante y los valores del marcador de peroxidación lipídica, MDA. Se ha descrito, que la peroxidación lipídica tiene un papel importante en el desarrollo de aterosclerosis (134). Los resultados muestran que a pesar de que no hay diferencias en la capacidad antioxidante en suero, las ratas alimentadas con nopal presentaron valores significativamente menores de MDA en suero (Tabla 1, Anexo I). De esta manera, aunque el incremento en la cantidad de VLDLs en suero podría parecer ser un hallazgo preocupante, la disminución de los valores de MDA en suero podrían sugerir que esta acumulación no es del todo patológica. Aunado esto, la disminución observada en los valores de colesterol total en suero y de las diferentes subclases de LDLs, en las ratas alimentadas con nopal, apoyan esta hipótesis.

Los hallazgos en el estrés oxidante podrían apuntar hacia los componentes antioxidantes en el nopal, como parcialmente responsables de la disminución en la esteatosis hepática. Sin embargo, es importante mencionar que otros componentes bioactivos del nopal, tales como la fibra dietaria, podrían también estar involucrados. En la literatura se ha descrito que la adición de fibra dietaria puede por un lado modificar la absorción de lípidos a nivel intestinal, efecto que es dependiente del tipo de fibra (135) y por otro mejorar la acumulación de lípidos en hígado (136).

A pesar de que la dieta control y la dieta con nopal contienen el mismo porcentaje de fibra, el incremento en los valores de triglicéridos, en el grupo alimentado con nopal a las 2 horas de alimentación, nos llevó a pensar que el tipo de fibra presente en el nopal podría modificar la cinética de absorción de triglicéridos y esto podría asociarse con la mejora en esteatosis hepática. Para poder evaluar lo anterior, en un nuevo estudio con ratas Zucker se evaluó la absorción de lípidos en presencia de nopal o celulosa, como la fuente de fibra de la dieta control. Este estudio se realizó tanto en ratas sin ningún tratamiento previo, como en ratas alimentadas durante 7 semanas con nopal, para mimetizar nuestro primer estudio.

El estudio agudo mostró que la presencia de fibra, tanto la celulosa como la proveniente del nopal, parecieran disminuir la absorción intestinal del bolo de lípidos, sin embargo el efecto de

la celulosa no es diferente del nopal. En el estudio crónico, en la curva de absorción de lípidos, no hubo diferencias entre el nopal y la celulosa, y por el contrario a las 5 horas, la concentraciones de triglicéridos en suero parecieran mayores con el bolo de nopal. Este hallazgo indica que la absorción de lípidos no es diferente en las ratas alimentadas con nopal, por lo que posiblemente este no sea uno de los mecanismos.

Es importante mencionar que la modificación en la absorción de lípidos, no es el único mecanismo por el cual la fibra dietaria puede actuar. La adición de diferentes fuentes de fibra puede, a través de fermentación por la microbiota, producir ácidos grasos de cadena corta que son metabólicamente activos. Por otro lado, algunos estudios en modelos animales han descrito que la adición de fibra soluble puede modificar la fisiología intestinal y esto se ha asociado a la mejora en esteatosis hepática (84).

Para determinar si el consumo de nopal tenía un efecto sobre la fisiología intestinal se planteó un nuevo estudio. El objetivo de este estudio fue utilizar un modelo más fisiológico de obesidad, en donde adicionalmente se han reportado alteraciones en la fisiología intestinal que correlacionan con el grado de adiposidad (85).

Los resultados de este estudio muestran, de manera muy interesante, que a pesar de no haber diferencias en el peso corporal, la ratas alimentadas con una dieta alta en grasa + nopal (HF-N) desarrollaron significativamente menos adiposidad que las ratas alimentadas únicamente con una dieta alta en grasa (HF). En cuanto a los parámetros bioquímicos en suero, ningún grupo presentó valores fuera de rango, lo que nos llevo a pensar que la longitud del estudio no fue suficiente para presentar alteraciones metabólicas de esta naturaleza.

Considerando los cambios observados en adiposidad se midieron algunas adipocinas que se han visto modificados por la presencia de obesidad (56). La leptina, una adipocina que está involucrada en la regulación de la ingesta de alimento, es una de ellas. Se ha reportado que las concentraciones de leptina correlacionan positivamente con la masa de tejido adiposo. En sujetos obesos, a pesar de los altos valores de leptina, no se tiene el efecto anorexigénico esperado, por lo que se ha propuesto la presencia de resistencia a la leptina. Adicionalmente se ha descrito que la leptina estimula la producción de ERO y la secreción citocinas proinflamatorias tales como TNF α e IFN γ , por lo que también se considera una hormona proinflamatoria (56). Acorde con las diferencias en adiposidad, las ratas HF-N presentaron valores significativamente menores de leptina que las ratas únicamente con dieta alta en grasa. Los valores anteriores, de acuerdo con la literatura, correlacionaron positivamente con el porcentaje de adiposidad.

La obesidad se ha asociado a una inflamación crónica de bajo grado (metainflamación). En donde el tejido adiposo mediante la acumulación de macrófagos, mantiene activa esta inflamación (32). Se ha descrito que en obesidad el área media de los adipocitos correlaciona con el grado de inflamación (117). Por lo tanto, se midió el área media de los adipocitos del tejido adiposo mesentérico y subcutáneo. Aunque no se encontraron diferencias en el área media de los adipocitos mesentéricos, el área media de los adipocitos subcutáneos fue menor en las ratas HF-N, en comparación con las HF. Los resultados anteriores nos sugieren que sería importante medir marcadores de inflamación en el tejido adiposo subcutáneo, con el fin de determinar si en efecto el consumo de nopal atenúa los procesos inflamatorios en este tejido. Adicionalmente, el cúmulo de resultados nos abren una nueva línea, en donde sería muy interesante ahondar en procesos metabólicos en el tejido adiposo, tales como lipólisis y lipogénesis.

Recientemente se ha sugerido que la metainflamación característica de la obesidad, puede estar relacionada con una disfuncionalidad del epitelio intestinal (88). Algunos autores sugieren que la alteración de la microbiota, conocida como disbiosis, estimula la activación del sistema inmune, produciendo así procesos inflamatorios tanto en intestino como a nivel sistémico (90, 137). Otros sugieren, que aunado a esto, alteraciones en la permeabilidad intestinal, inducidas por dietas altas en grasa, pueden desregular el paso de componentes bacterianos, tales como lipopolisacáridos, en un fenómeno llamado endotoxemia metabólica, que a su vez activarán la respuesta inflamatoria tanto a nivel de tejido adiposo como sistémica (81). Aunque la evidencia no es concluyente, algunos estudios muestran que la sección intestinal con mayor alteración es el íleon. Los resultados en el modelo de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa muestran que no existe ninguna modificación en la permeabilidad tanto trans como paracelular en el íleon entre las ratas con dieta control o dieta alta en grasa o con la presencia de nopal. Sin embargo, esto no necesariamente refleja que no existen cambios en el resto de las secciones intestinales. Lo cual nos sugiere que aún es necesario medir la permeabilidad intestinal en las diferentes partes del intestino delgado y el colon.

Estudios en modelos animales de colitis e inflamación intestinal han observado una asociación positiva entre la disfunción del tejido adiposo y la inflamación intestinal (138). En el estudio de ratas alimentadas con dieta alta en grasa, se midieron tanto marcadores de inflamación como la presencia de ERO, ya que estas últimas también inducen inflamación. De manera interesante, el ciego de las ratas HF-N presentó menor actividad de la mieloperoxidasa (marcador de inflamación) en comparación con las ratas HF. Aunque no se observó la misma tendencia en colon, tanto en ciego como en colon se observaron menores valores de ERO en el grupo HF-N

en comparación con el HF. Aunque aún faltan más resultados para corroborar, es posible especular que el nopal tiene un efecto sobre los procesos inflamatorios en el ciego y el colon.

El ciego es conocido como la sección del intestino en donde se lleva a cabo la mayor fermentación por la microbiota intestinal (121). Comúnmente se ha usado el peso del ciego como una medida de la robustez de la fermentación (139, 140). En nuestros resultados las ratas HF-N presentaron un peso relativo del ciego, así como el contenido del mismo significativamente mayor que las ratas HF. Considerando la naturaleza fermentable de la fibra dietaria presente en el nopal, esto podría traducirse en una mayor fermentación. Se ha descrito que dependiendo del tipo de fibra los patrones de fermentación se modifican (92), dando como resultado cambios en la proporción de ácidos grasos de cadena corta. Por otro lado, el análisis de correlación entre las variables medidas, arrojó que tanto en peso relativo del ciego como su contenido están significativamente asociados con el porcentaje de adiposidad, en donde a menor peso del ciego mayor adiposidad. Este hallazgo nos sugiere un posible enlace entre lo que está sucediendo en el ciego y el desarrollo de adiposidad. Considerando que en esta sección intestinal, es donde está la mayor concentración de microbiota y donde ocurre la mayor fermentación, es posible especular que la pieza faltante en esta asociación puede ser el perfil de ácidos grasos de cadena corta o bien el tipo de microbiota intestinal.

Como se mencionó anteriormente, los ácidos grasos de cadena corta tienen actividades metabólicas diferentes (141, 142). De esta manera, el siguiente paso es analizar los ácidos grasos de cadena corta en el contenido del ciego y en el suero de las ratas, así como evaluar el tipo de microbiota que está presente en los diferentes grupos. Aunque aún se desconocen muchos aspectos relacionados con la microbiota intestinal, Neyrinck y colaboradores demostraron una asociación significativa entre la cantidad de *Roseburia spp.* y el porcentaje de tejido adiposo subcutáneo (96). En este mismo estudio, se observó que la cantidad de estas bacterias también correlacionaba inversamente con el contenido de triglicéridos en hígado. En un estudio adicional Neyrinck y colaboradores demostraron, en ratones alimentados con una dieta alta en grasa, que la adición de arabinoxilanos, un tipo de fibra dietaria fermentable, prevenía la hipertrofia de los adipocitos subcutáneos inducida por la dieta (95). Por lo tanto este tipo de análisis nos ayudaría a dilucidar si es a través de un cambio en la microbiota o sus patrones de fermentación, que el nopal modifica el desarrollo de adiposidad en las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.

Otro de los efectos del nopal sobre la fisiología intestinal fue en el largo de las vellosidades. En procesos inflamatorios se ha observado que hay modificaciones en la morfología intestinal. Nuestros resultados muestran que aunque el nopal no modifica el largo de las vellosidades intestinales en ratas alimentadas con dieta control, el grupo HF-N presentó valores significativamente mayores en el largo de las vellosidades intestinales en secciones de yeyuno en comparación con el grupo HF.

Los resultados del presente trabajo muestran que el consumo de nopal tiene efectos importantes sobre la fisiología en modelos animales de obesidad y en las anomalías derivadas de las mismas. Considerando los graves problemas de obesidad en México, estos hallazgos son muy relevantes y sustentan la necesidad de más estudios tanto para dilucidar los mecanismos como para evaluar el efecto en humanos.

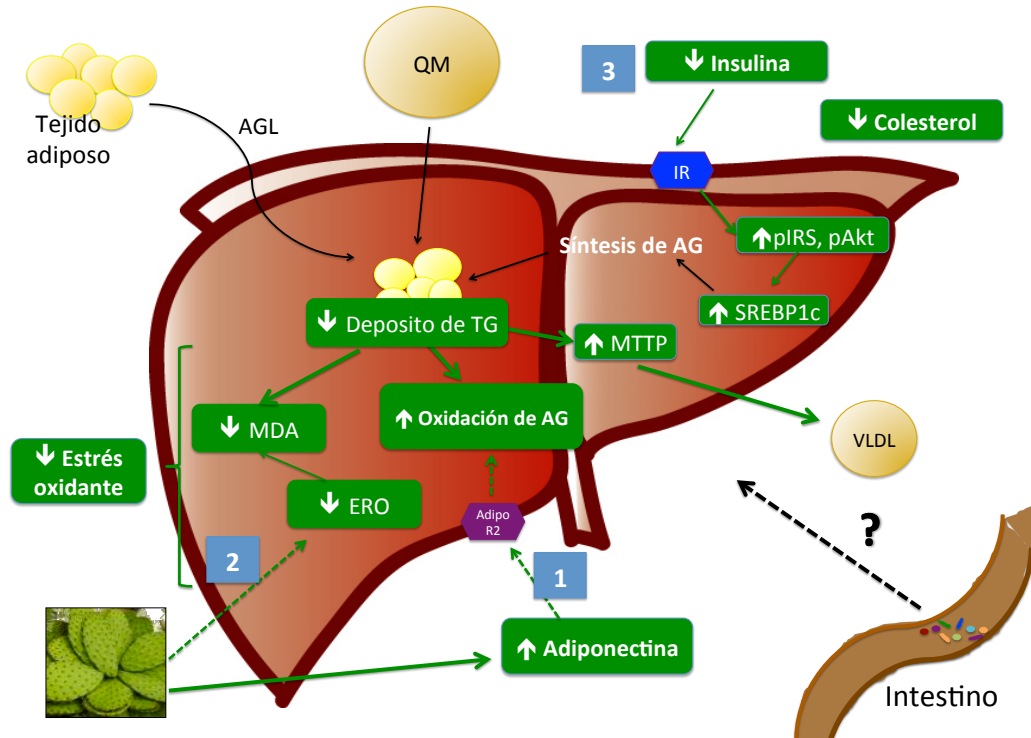


Figura 44. Efecto del consumo de nopal en la esteatosis hepática e un modelo de obesidad, la rata Zucker (*fa/fa*). Los mecanismos por lo cuales el nopal mejora la esteatosis hepática son: 1) a través del aumento en adiponectina, posiblemente ligado al aumento en la oxidación 2) la reducción en el estrés oxidante y 3) la disminución en los valores de insulina. Aunque se requieren más estudios en la funcionalidad intestinal y la microbiota podrían ser un cuarto mecanismo. AGL; Ácidos grasos libres, ERO; especies reactivas de oxígenos, MDA; malondialdehído, QM; quilomicrones.

CONCLUSIONES

El consumo de nopal en un modelo de obesidad, la rata Zucker (*fa/fa*) atenúa el desarrollo de esteatosis hepática, disminuye el estrés oxidante y mejora la señalización hepática de insulina, contribuyendo a una disminución en el daño hepático. Paralelamente disminuye los valores de colesterol total y partículas LDL en suero e incrementa los valores de adiponectina.

La disminución en la acumulación de triglicéridos en hígado responde a una mayor oxidación de ácidos grasos mediada por PPAR α y a una mayor exportación de triglicéridos a través de las partículas VLDLs. Aunque aún desconocemos el mecanismo específico por el cual el nopal modifica estas vías del metabolismo de lípidos en hígado, los resultados sugieren que:

- no es mediado por una modificación en la absorción de lípidos a nivel intestinal
- está asociado al incremento observado en los valores de adiponectina, la mejora en los niveles de insulina, la señalización de insulina y la atenuación del estrés oxidante en hígado.

El estudio realizado en ratas Sprague-Dawley sugiere que el consumo de nopal también tiene un efecto sobre el desarrollo de adiposidad en un modelo inducido a obesidad por dieta alta en grasa, que posiblemente está asociado a cambios en la fisiología intestinal. Sin embargo, aún se requieren más estudios.

En cuanto a los componentes bioactivos del nopal es importante resaltar que nuestros resultados de acuerdo con la literatura apuntan a que el contenido de fibra dietaria y posiblemente los polifenoles presentes en el nopal son los responsables de los efectos observados.

Aunque aún se requieren más estudios mecanísticos y en humanos, en conjunto estos resultados aportan evidencia de que el nopal puede ser potencialmente usado como alimento funcional para ayudar a la prevención de enfermedades derivadas de la obesidad, la cual es un grave problema de salud en México.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en nuestro grupo abren un gran campo de estudio en el entendimiento de los efectos del consumo de nopal sobre la fisiología de la obesidad. Específicamente sobre el desarrollo de esteatosis hepática y su potencial uso para ayudar al tratamiento y prevención de las anomalías derivadas de la obesidad.

Aunque el efecto del nopal es claro en el modelo genético de obesidad, la rata Zucker (*fa/fa*) presenta anomalías en la señalización de la leptina. Esta hormona contribuye al desarrollo de NAFLD, por lo que sería importante evaluar el efecto del nopal en un modelo de esteatosis hepática inducido por dieta.

En el presente trabajo se proponen algunos mecanismos; sin embargo, la realización de estudios *in vitro* con los polifenoles del nopal nos ayudarían a evaluar si en efecto, estos son parcialmente responsables de la disminución observada en el estrés oxidante.

Por otro lado para poder dilucidar el papel del consumo de nopal en el desarrollo de adiposidad, en las ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa, el siguiente paso es evaluar el tipo de microbiota presente en el contenido cecal de las ratas. Tomando en cuenta el papel metabólico de los ácidos grasos de cadena corta producidos a partir de la fermentación de polisacáridos, sería relevante medir como el consumo de nopal modifica la proporción de estos en el intestino y en el suero.

Otros de los aspectos relevantes, considerando la asociación entre la inflamación intestinal y la metainflamación, sería medir la expresión de citocinas proinflamatorias tanto en las diferentes secciones intestinales como en los diferentes compartimentos del tejido adiposo.

Finalmente estudios de nuestro grupo, demostraron que el uso de un portafolio dietario que entre otros componentes, contiene nopal es capaz de mejorar la tolerancia a la glucosa (22). Por lo tanto sería de gran interés realizar intervenciones dietarias en humanos con síndrome metabólico y/o esteatosis hepática con el objetivo de evaluar si a nivel crónico, tanto con el nopal deshidratado utilizado en este estudio como el nopal fresco son capaces de modular las alteraciones características de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Stintzing FC, Carle R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry, technology, and uses. *Mol Nutr Food Res*. 2005 Feb;49(2):175-94.
2. Griffith MP. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *Am J Bot*. 2004 Nov;91(11):1915-21.
3. Santos-Zea L, Gutierrez-Urbe JA, Serna-Saldivar SO. Comparative analyses of total phenols, antioxidant activity, and flavonol glycoside profile of cladode flours from different varieties of *Opuntia* spp. *J Agric Food Chem*. 2011 Jul 13;59(13):7054-61.
4. Hernandez-Urbiola MI, Perez-Torrero E, Rodriguez-Garcia ME. Chemical analysis of nutritional content of prickly pads (*Opuntia ficus indica*) at varied ages in an organic harvest. *Int J Environ Res Public Health*. 2011 May;8(5):1287-95.
5. Rodriguez-Garcia ME, de Lira C, Hernandez-Becerra E, Cornejo-Villegas MA, Palacios-Fonseca AJ, Rojas-Molina I, et al. Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation. *Plant Foods Hum Nutr*. 2007 Sep;62(3):107-12.
6. Medina-Torres L, Vernon-Carter EJ, Gallegos-Infante JA, Rocha-Guzman NE, Herrera-Valencia EE, Calderas F, et al. Study of the antioxidant properties of extracts obtained from nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes after convective drying. *J Sci Food Agric*. 2011 Apr;91(6):1001-5.
7. McConn MM, Nakata PA. Oxalate reduces calcium availability in the pads of the prickly pear cactus through formation of calcium oxalate crystals. *J Agric Food Chem*. 2004 Mar 10;52(5):1371-4.
8. Vivanco Sepúlveda J. El delito de robo con homicidio : ensayo de una interpretación a la luz de la doctrina del delito-tipo. 2. ed. Santiago, Chile: NexisLexis; 2007.
9. Ginestra G, Parker ML, Bennett RN, Robertson J, Mandalari G, Narbad A, et al. Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *J Agric Food Chem*. 2009 Nov 11;57(21):10323-30.
10. Cai WR, Gu XH, Tang H. Extraction, purification, and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta*. *Carbohydrate Polymers*. 2008 Feb 8;71(3):403-10.
11. Medina-Torres L, Brito-De La Fuente E, Torrestiana-Sanchez B, Katthain R. Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). *Food Hydrocolloids*. 2000 Sep;14(5):417-24.
12. Sepulveda E, Saenz C, Aliaga E, Aceituno C. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *Journal of Arid Environments*. 2007 Mar;68(4):534-45.
13. Goycoolea FM, Cardenas A. Pectins from *Opuntia* spp.: a short review. *J Profess Assoc Cactus Develop*. 2003;5:17-29.
14. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 2005 Jan;81(1 Suppl):317S-25S.
15. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*. 2005 Jan;81(1 Suppl):215S-7S.
16. Guevara-Figueroa T, Jimenez-Islas H, Reyes-Escogido ML, Mortensen AG, Laursen BB, Lin LW, et al. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis*. 2010 Sep;23(6):525-32.
17. Feugang JM, Konarski P, Zou D, Stintzing FC, Zou C. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Front Biosci*. 2006;11:2574-89.
18. Frati AC, Xilotl Diaz N, Altamirano P, Ariza R, Lopez-Ledesma R. The effect of two sequential doses of *Opuntia streptacantha* upon glycemia. *Arch Invest Med (Mex)*. 1991 Jul-Dec;22(3-4):333-6.

19. Luo C, Zhang W, Sheng C, Zheng C, Yao J, Miao Z. Chemical composition and antidiabetic activity of *Opuntia Milpa Alta* extracts. *Chem Biodivers*. 2010 Dec;7(12):2869-79.
20. Zhao LY, Lan QJ, Huang ZC, Ouyang LJ, Zeng FH. Antidiabetic effect of a newly identified component of *Opuntia dillenii* polysaccharides. *Phytomedicine*. 2011 Jun 15;18(8-9):661-8.
21. Lopez-Romero P, Pichardo-Ontiveros E, Avalia-Nava A, Pedraza-Chaverri J, Tovar AR, Torres N, editors. Experimental Biology Antihyperglycemic and antioxidant activity of nopal (*Opuntia ficus-indica*) in patients with type 2 diabetes; 2012; San Diego, CA, USA.
22. Guevara-Cruz M, Tovar AR, Aguilar-Salinas CA, Medina-Vera I, Gil-Zenteno L, Hernandez-Viveros I, et al. A dietary pattern including nopal, chia seed, soy protein, and oat reduces serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome. *J Nutr*. 2012 Jan;142(1):64-9.
23. Fernandez ML, Lin EC, Trejo A, McNamara DJ. Prickly pear (*Opuntia* sp.) pectin reverses low density lipoprotein receptor suppression induced by a hypercholesterolemic diet in guinea pigs. *J Nutr*. 1992 Dec;122(12):2330-40.
24. Fernandez ML, Lin EC, Trejo A, McNamara DJ. Prickly pear (*Opuntia* sp.) pectin alters hepatic cholesterol metabolism without affecting cholesterol absorption in guinea pigs fed a hypercholesterolemic diet. *J Nutr*. 1994 Jun;124(6):817-24.
25. Zhao LY, Huang W, Yuan QX, Cheng J, Huang ZC, Ouyang LJ, et al. Hypolipidaemic effects and mechanisms of the main component of *Opuntia dillenii* Haw. polysaccharides in high-fat emulsion-induced hyperlipidaemic rats. *Food Chem*. 2012 Sep 15;134(2):964-71.
26. Panico AM, Cardile V, Garufi F, Puglia C, Bonina F, Ronsisvalle S. Effect of hyaluronic acid and polysaccharides from *Opuntia ficus indica* (L.) cladodes on the metabolism of human chondrocyte cultures. *J Ethnopharmacol*. 2007 May 4;111(2):315-21.
27. Schepetkin IA, Xie G, Kirpotina LN, Klein RA, Jutila MA, Quinn MT. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*. *Int Immunopharmacol*. 2008 Oct;8(10):1455-66.
28. Galati EM, Mondello MR, Giuffrida D, Dugo G, Miceli N, Pergolizzi S, et al. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) mill. Fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. *J Agric Food Chem*. 2003 Aug 13;51(17):4903-8.
29. Park EH, Chun MJ. Wound healing activity of *Opuntia ficus-indica*. *Fitoterapia*. 2001 Feb;72(2):165-7.
30. Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, Lee EH, Lee J, Song YS, et al. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res*. 2003 Mar 7;965(1-2):130-6.
31. Kim JH, Park SM, Ha HJ, Moon CJ, Shin TK, Kim JM, et al. *Opuntia ficus-indica* attenuates neuronal injury in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia. *J Ethnopharmacol*. 2006 Mar 8;104(1-2):257-62.
32. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415-45.
33. Gomez-Zorita S, Fernandez-Quintela A, Macarulla MT, Aguirre L, Hijona E, Bujanda L, et al. Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *Br J Nutr*. 2012 Jan;107(2):202-10.
34. Caballero B. The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol Rev*. 2007;29:1-5.
35. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):635-43.
36. Voegelé C. Etiology of Obesity. In: Munsch S B, editor. *Obesity and Binge Eating Disorder: Bibl Psychiatr*. Basel, Karger,; 2005. p. 62–73.
37. Meigs JB. Epidemiology of type 2 diabetes and cardiovascular disease: translation from population to prevention: the Kelly West award lecture 2009. *Diabetes Care*. 2010 Aug;33(8):1865-71.

38. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2011 Jun;121(6):2111-7.
39. Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Abdo T, Tripathy D, Chaudhuri A, et al. Increase in intranuclear nuclear factor kappaB and decrease in inhibitor kappaB in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect. *Am J Clin Nutr*. 2004 Apr;79(4):682-90.
40. Zeyda M, Stulnig TM. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology*. 2009;55(4):379-86.
41. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*. 1997 Oct 9;389(6651):610-4.
42. Solinas G, Karin M. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J*. 2010 Aug;24(8):2596-611.
43. Zivkovic AM, German JB, Sanyal AJ. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr*. 2007 Aug;86(2):285-300.
44. Cortez-Pinto H, de Moura MC, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. *J Hepatol*. 2006 Jan;44(1):197-208.
45. Krawczyk M, Bonfrate L, Portincasa P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010 Oct;24(5):695-708.
46. Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009 May;19(4):291-302.
47. Parekh S, Anania FA. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2007 May;132(6):2191-207.
48. Liu Q, Bengmark S, Qu S. The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids Health Dis*. 2010;9:42.
49. Erickson SK. Nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl:S412-6.
50. Utzschneider KM, Kahn SE. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Dec;91(12):4753-61.
51. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011 Jun 24;332(6037):1519-23.
52. Lam TK, Carpentier A, Lewis GF, van de Werve G, Fantus IG, Giacca A. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 May;284(5):E863-73.
53. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005 May;115(5):1343-51.
54. Tomita K, Oike Y, Teratani T, Taguchi T, Noguchi M, Suzuki T, et al. Hepatic AdipoR2 signaling plays a protective role against progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2008 Aug;48(2):458-73.
55. Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*. 2009 Sep;50(3):957-69.
56. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb;11(2):85-97.
57. Petta S, Muratore C, Craxi A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future. *Dig Liver Dis*. 2009 Sep;41(9):615-25.
58. Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology*. 2006 Sep;131(3):934-45.
59. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*. 2003 Jul;112(1):91-100.
60. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004 Jul;114(2):147-52.

61. Pan M, Cederbaum AI, Zhang YL, Ginsberg HN, Williams KJ, Fisher EA. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *J Clin Invest.* 2004 May;113(9):1277-87.
62. Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res.* 2009 Jan;48(1):1-26.
63. Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, Puig O, Arkkila P, Kiviluoto T, et al. Gene expression in human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008 May;294(5):G1281-7.
64. Koonen DP, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CL, Ong H, et al. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes.* 2007 Dec;56(12):2863-71.
65. Nagle CA, Klett EL, Coleman RA. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S74-9.
66. Ginsberg HN, Fisher EA. The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S162-6.
67. Mensenkamp AR, Havekes LM, Romijn JA, Kuipers F. Hepatic steatosis and very low density lipoprotein secretion: the involvement of apolipoprotein E. *J Hepatol.* 2001 Dec;35(6):816-22.
68. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):455-62.
69. Jiang XC, Li Z, Liu R, Yang XP, Pan M, Lagrost L, et al. Phospholipid transfer protein deficiency impairs apolipoprotein-B secretion from hepatocytes by stimulating a proteolytic pathway through a relative deficiency of vitamin E and an increase in intracellular oxidants. *J Biol Chem.* 2005 May 6;280(18):18336-40.
70. Hussain MM, Shi J, Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res.* 2003 Jan;44(1):22-32.
71. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, Webb M, Blendis L, Halpern Z, et al. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *J Hepatol.* 2007 Nov;47(5):711-7.
72. Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem.* 2007 Mar;18(3):184-95.
73. Capanni M, Calella F, Biagini MR, Genise S, Raimondi L, Bedogni G, et al. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Apr 15;23(8):1143-51.
74. Tovar AR, Torre-Villalvazo I, Ochoa M, Elias AL, Ortiz V, Aguilar-Salinas CA, et al. Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J Lipid Res.* 2005 Sep;46(9):1823-32.
75. Park HJ, DiNatale DA, Chung MY, Park YK, Lee JY, Koo SI, et al. Green tea extract attenuates hepatic steatosis by decreasing adipose lipogenesis and enhancing hepatic antioxidant defenses in ob/ob mice. *J Nutr Biochem.* 2011 Apr;22(4):393-400.
76. Yamazaki T, Kishimoto K, Miura S, Ezaki O. Dietary beta-conglycinin prevents fatty liver induced by a high-fat diet by a decrease in peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 protein. *J Nutr Biochem.* 2012 Feb;23(2):123-32.
77. Kathirvel E, Morgan K, Nandgiri G, Sandoval BC, Caudill MA, Bottiglieri T, et al. Betaine improves nonalcoholic fatty liver and associated hepatic insulin resistance: a potential mechanism for hepatoprotection by betaine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010 Nov;299(5):G1068-77.
78. Vergara-Jimenez M, Conde K, Erickson SK, Fernandez ML. Hypolipidemic mechanisms of pectin and psyllium in guinea pigs fed high fat-sucrose diets: alterations on hepatic cholesterol metabolism. *J Lipid Res.* 1998 Jul;39(7):1455-65.

79. Aprikian O, Busserolles J, Manach C, Mazur A, Morand C, Davicco MJ, et al. Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats. *J Nutr*. 2002 Jul;132(7):1969-76.
80. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1821-30.
81. Raybould HE. Gut microbiota, epithelial function and derangements in obesity. *J Physiol*. 2012 Feb 1;590(Pt 3):441-6.
82. Ding S, Lund PK. Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011 Jul;14(4):328-33.
83. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JL. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1022-3.
84. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009 Aug;58(8):1091-103.
85. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Aug;299(2):G440-8.
86. Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NM, Magness S, et al. High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS One*. 2010;5(8):e12191.
87. Li H, Lelliott C, Hakansson P, Ploj K, Tuneld A, Verolin-Johansson M, et al. Intestinal, adipose, and liver inflammation in diet-induced obese mice. *Metabolism*. 2008 Dec;57(12):1704-10.
88. Lam YY, Ha CW, Campbell CR, Mitchell AJ, Dinudom A, Oscarsson J, et al. Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. *PLoS One*. 2012;7(3):e34233.
89. Sharma R, Young C, Neu J. Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:305879.
90. Moreira AP, Texeira TF, Ferreira AB, Peluzio Mdo C, Alfnas Rde C. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr*. 2012 Sep;108(5):801-9.
91. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*. 2007 Nov;50(11):2374-83.
92. Musso G, Gambino R, Cassader M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annu Rev Med*. 2011;62:361-80.
93. Ghoshal S, Witta J, Zhong J, de Villiers W, Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res*. 2009 Jan;50(1):90-7.
94. Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2011 Sep;35(5 Suppl):14S-20S.
95. Neyrinck AM, Possemiers S, Druart C, Van de Wiele T, De Backer F, Cani PD, et al. Prebiotic effects of wheat arabinoxylan related to the increase in bifidobacteria, Roseburia and Bacteroides/Prevotella in diet-induced obese mice. *PLoS One*. 2011;6(6):e20944.
96. Neyrinck AM, Possemiers S, Verstraete W, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. Dietary modulation of clostridial cluster XIVa gut bacteria (Roseburia spp.) by chitin-glucan fiber improves host metabolic alterations induced by high-fat diet in mice. *J Nutr Biochem*. 2012 Jan;23(1):51-9.

97. Zhang X, Zhao Y, Zhang M, Pang X, Xu J, Kang C, et al. Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats. *PLoS One*. 2012;7(8):e42529.
98. Aleixandre A, Miguel M. Zucker Rats as an Experimental Model for the Study of Various Diseases. *Endocrinol Nutr*. 2008 May;55(5):217-22.
99. Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, et al. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet*. 1996 May;13(1):18-9.
100. Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis*. 2001;21(1):89-104.
101. Serkova NJ, Jackman M, Brown JL, Liu T, Hirose R, Roberts JP, et al. Metabolic profiling of livers and blood from obese Zucker rats. *J Hepatol*. 2006 May;44(5):956-62.
102. Buque X, Martinez MJ, Cano A, Miquilena-Colina ME, Garcia-Monzon C, Aspichueta P, et al. A subset of dysregulated metabolic and survival genes is associated with severity of hepatic steatosis in obese Zucker rats. *J Lipid Res*. 2010 Mar;51(3):500-13.
103. Arredondo A, Zuniga A. Economic consequences of epidemiological changes in diabetes in middle-income countries: the Mexican case. *Diabetes Care*. 2004 Jan;27(1):104-9.
104. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993 Nov;123(11):1939-51.
105. Galan A, Hernandez J, Jimenez O. Measurement of blood acetoacetate and beta-hydroxybutyrate in an automatic analyser. *J Autom Methods Manag Chem*. 2001;23(3):69-76.
106. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest*. 1998 Mar 15;101(6):1354-61.
107. Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc*. 2007;2(2):287-95.
108. Esser V, Kuwajima M, Britton CH, Krishnan K, Foster DW, McGarry JD. Inhibitors of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I limit the action of proteases on the enzyme. Isolation and partial amino acid analysis of a truncated form of the rat liver isozyme. *J Biol Chem*. 1993 Mar 15;268(8):5810-6.
109. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
110. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.
111. Aleixandre de Artinano A, Miguel Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br J Nutr*. 2009 Nov;102(9):1246-53.
112. Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest*. 2012 Jan 3;122(1):4-12.
113. Blom WA, Lluch A, Stafleu A, Vinoy S, Holst JJ, Schaafsma G, et al. Effect of a high-protein breakfast on the postprandial ghrelin response. *Am J Clin Nutr*. 2006 Feb;83(2):211-20.
114. Bollyky J, Greenbaum CJ. Editorial: The role of glucagon in postprandial hyperglycemia--the jury's still out. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Aug;92(8):2879-81.
115. Matsuzawa T, Hayashi Y, Nomura M, Unno T, Igarashi T, Furuya T, et al. A survey of the values of clinical chemistry parameters obtained for a common rat blood sample in ninety-eight Japanese laboratories. *J Toxicol Sci*. 1997 Feb;22(1):25-44.
116. Veilleux A, Caron-Jobin M, Noel S, Laberge PY, Tchernof A. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. *Diabetes*. 2011 May;60(5):1504-11.
117. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1796-808.

118. Schedle K, Pfaffl MW, Plitzner C, Meyer HH, Windisch W. Effect of insoluble fibre on intestinal morphology and mRNA expression pattern of inflammatory, cell cycle and growth marker genes in a piglet model. *Arch Anim Nutr.* 2008 Dec;62(6):427-38.
119. Dongowski G, Huth M, Gebhardt E, Flamme W. Dietary fiber-rich barley products beneficially affect the intestinal tract of rats. *J Nutr.* 2002 Dec;132(12):3704-14.
120. Gomez-Conde MS, Garcia J, Chamorro S, Eiras P, Rebollar PG, Perez de Rozas A, et al. Neutral detergent-soluble fiber improves gut barrier function in twenty-five-day-old weaned rabbits. *J Anim Sci.* 2007 Dec;85(12):3313-21.
121. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology.* 2009 Jan;136(1):65-80.
122. Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. *PLoS One.* 2012;7(10):e47713.
123. Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology.* 2009 Jan;49(1):306-17.
124. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2001 Aug;50(8):1844-50.
125. Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2007 Jul 14;13(26):3540-53.
126. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol.* 2008 Jan 14;14(2):193-9.
127. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2006 Dec 14;444(7121):840-6.
128. Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Mar;9(3):193-205.
129. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005 Mar;54(3):603-8.
130. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta.* 2011 Jul 15;412(15-16):1297-305.
131. Gormaz JG, Rodrigo R, Videla LA, Beems M. Biosynthesis and bioavailability of long-chain polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res.* 2010 Oct;49(4):407-19.
132. Lee JC, Kim HR, Kim J, Jang YS. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *J Agric Food Chem.* 2002 Oct 23;50(22):6490-6.
133. Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology.* 2001 Jul;34(1):13-8.
134. Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 2010 Oct;44(10):1125-71.
135. Vahouny GV, Satchithanandam S, Chen I, Tepper SA, Kritchevsky D, Lightfoot FG, et al. Dietary fiber and intestinal adaptation: effects on lipid absorption and lymphatic transport in the rat. *Am J Clin Nutr.* 1988 Feb;47(2):201-6.
136. Parnell JA, Raman M, Rioux KP, Reimer RA. The potential role of prebiotic fibre for treatment and management of non-alcoholic fatty liver disease and associated obesity and insulin resistance. *Liver Int.* 2012 May;32(5):701-11.
137. Cani PD, Delzenne NM. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol Ther.* 2011 May;130(2):202-12.

138. Thomaz MA, Acedo SC, de Oliveira CC, Pereira JA, Priolli DG, Saad MJ, et al. Methotrexate is effective in reactivated colitis and reduces inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue during intestinal inflammation. *Pharmacol Res.* 2009 Oct;60(4):341-6.
139. Henningsson AM, Nyman EM, Bjorck IM. Content of short-chain fatty acids in the hindgut of rats fed processed bean (*Phaseolus vulgaris*) flours varying in distribution and content of indigestible carbohydrates. *Br J Nutr.* 2001 Sep;86(3):379-89.
140. Frejnagel S, Juskiewicz J. Dose-dependent effects of polyphenolic extracts from green tea, blue-berried honeysuckle, and chokeberry on rat caecal fermentation processes. *Planta Med.* 2011 Jun;77(9):888-93.
141. Cook SI, Sellin JH. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1998 Jun;12(6):499-507.
142. Vinolo MA, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients.* 2011 Oct;3(10):858-76.

ANEXO I

1. Efecto del consumo de nopal sobre parámetros de estrés oxidante en el hígado de ratas Zucker (*fa/fa*) obesas; relación con la esteatosis hepática.

Esta sección de estudio fue realizado en colaboración con el Laboratorio del Dr. José Pedraza Chaverri, y los resultados obtenidos por la M en C. Azalia Ávila Nava.

Considerando que el estrés oxidante contribuye de manera importante a la evolución de NAFLD se midieron tanto las especies reactivas de oxígeno como el marcador de peroxidación, lipídica malondialdehido (MDA) en hígado. Se observó una disminución significativa en las ERO en el grupo alimentado con nopal en ayuno. Consecuentemente los valores de MDA en el hígado de las ratas alimentadas con nopal fueron significativamente mas bajos que en los grupos control tanto en ayuno como en postprandio (Figura I).

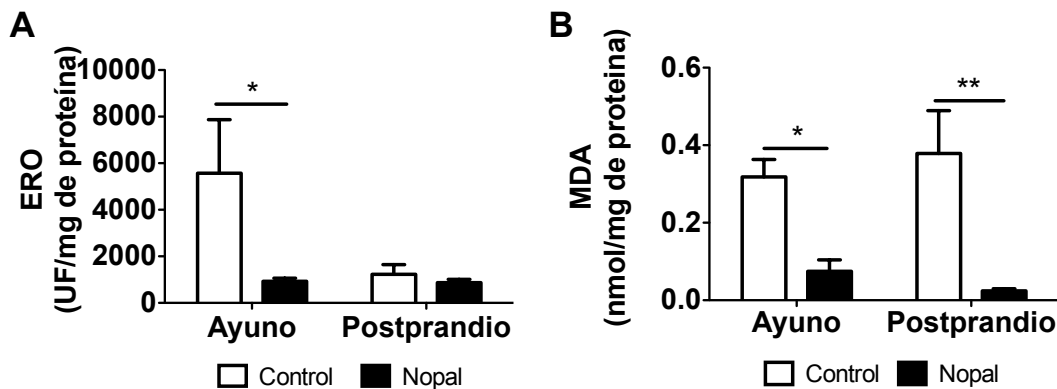


Figura I. Marcadores de estrés oxidante en hígado. A) Valores de ERO de oxígeno en hígado, B) Valores de MDA en hígado. Valores promedio \pm EE. n = 5. *P<0.05, **P<0.01.

Para dilucidar si la disminución observada en los parámetros de estrés oxidante se debía a un aumento en las defensas antioxidantes, se midió la expresión del mensajero y la actividad de las principales enzimas antioxidantes. Aunque la expresión del superóxido dismutasa 1 (SOD1) esta incrementada en ayuno en el grupo alimentado con nopal, no se observaron diferencias en la actividad de las enzimas por lo que se podría concluir que no hay modificación en las enzimas antioxidantes por el consumo de nopal (Tabla I).

Para evaluar si la disminución en el estrés oxidante se extendía hacia la circulación se midió la actividad antioxidante y la concentración de MDA en suero. Aunque no se

observaron diferencias en la capacidad antioxidante en suero, tanto en ayuno como en postprandio los grupos alimentados con nopal presentaron valores significativamente mas bajos de MDA, en comparación con el control.

Tabla I. Marcadores de estatus antioxidante en hígado y suero de las ratas Zucker (*fa/fa*) obesas alimentadas con dieta control o dieta control + nopal.

	Ayuno		Postprandio		Valor de <i>P</i>		<i>P</i> interacción ²
	Control	Nopal	Control	Nopal	D	EF	D x EF
Hígado							
<i>Cat</i> , expresión relativa	1.1 ± 0.07 ^b	1.6 ± 0.04 ^a	1.0 ± 0.04 ^b	0.7 ± 0.06 ^c	NS	< 0.001	< 0.001
<i>Gr</i> , expresión relativa	1.0 ± 0.05	1.3 ± 0.05	0.5 ± 0.05	0.6 ± 0.05	NS	< 0.0001	NS
<i>Gpx</i> , expresión relativa	1.1 ± 0.07	1.3 ± 0.05	0.6 ± 0.03	1.8 ± 0.8	NS	NS	NS
<i>Sod-1</i> (Cu/Zn), expresión relativa	1.4 ± 0.4 ^b	3.9 ± 0.30 ^a	1.1 ± 0.06 ^b	1.6 ± 0.3 ^b	< 0.01	< 0.01	< 0.01
<i>Sod-2</i> (Mn), expresión relativa	1.0 ± 0.03	1.0 ± 0.11	0.8 ± 0.04	0.8 ± 0.2	NS	NS	NS
Actividad de CAT, U/mg de proteína	0.3 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.02	< 0.01	NS	NS
Actividad de GR, U/mg de proteína	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.003	0.05 ± 0.004	0.04 ± 0.002	NS	NS	NS
Actividad de GPX, U/mg de proteína	0.2 ± 0.02 ^a	0.22 ± 0.02 ^a	0.2 ± 0.01 ^a	0.2 ± 0.01 ^a	NS	NS	< 0.05
Actividad total de SOD, U/mg de proteína	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.02	0.2 ± 0.02	< 0.05	NS	NS
Suero							
Capacidad antioxidante en suero, atrapamiento de DPPH, %	29.1 ± 3.3	32.4 ± 1.0	29.1 ± 2	33.4 ± 2	NS	NS	NS
MDA en suero, μmol/L	4.0 ± 0.3	2.77 ± 0.6	5.01 ± 0.06	2.69 ± 0.3	< 0.05	NS	NS

¹Valores promedio ± EE, n=5-6. Promedios en una línea con letras diferentes son diferentes estadísticamente. D; Dieta, EF; estado fisiológico,; NS, no significativo.

²Las diferencias se basan en una ANOVA de dos vías en donde se utilizó la prueba post hoc de Bonferroni.

Opuntia ficus indica (Nopal) Attenuates Hepatic Steatosis and Oxidative Stress in Obese Zucker (*fa/fa*) Rats^{1–3}

Sofía Morán-Ramos,^{4,6} Azalia Avila-Nava,⁵ Armando R. Tovar,⁴ José Pedraza-Chaverri,⁵ Patricia López-Romero,⁴ and Nimbe Torres^{4*}

⁴Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico; ⁵Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; and ⁶Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with multiple factors such as obesity, insulin resistance, and oxidative stress. Nopal, a cactus plant widely consumed in the Mexican diet, is considered a functional food because of its antioxidant activity and ability to improve biomarkers of metabolic syndrome. The aim of this study was to assess the effect of nopal consumption on the development of hepatic steatosis and hepatic oxidative stress and on the regulation of genes involved in hepatic lipid metabolism. Obese Zucker (*fa/fa*) rats were fed a control diet or a diet containing 4% nopal for 7 wk. Rats fed the nopal-containing diet had ~50% lower hepatic TG than the control group as well as a reduction in hepatomegaly and biomarkers of hepatocyte injury such as alanine and aspartate aminotransferases. Attenuation of hepatic steatosis by nopal consumption was accompanied by a higher serum concentration of adiponectin and a greater abundance of mRNA for genes involved in lipid oxidation and lipid export and production of carnitine palmitoyltransferase-1 and microsomal TG transfer proteins in liver. Hepatic reactive oxygen species and lipid peroxidation biomarkers were significantly lower in rats fed nopal compared with the control rats. Furthermore, rats fed the nopal diet had a lower postprandial serum insulin concentration and a greater liver phosphorylated protein kinase B (pAKT):AKT ratio in the postprandial state. This study suggests that nopal consumption attenuates hepatic steatosis by increasing fatty acid oxidation and VLDL synthesis, decreasing oxidative stress, and improving liver insulin signaling in obese Zucker (*fa/fa*) rats. J. Nutr. doi: 10.3945/jn.112.165563.

Introduction

The excessive accumulation of fat in the liver in the absence of alcohol consumption [nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)⁷]

is observed in 25–30% of adults in industrialized countries (1). NAFLD is the most common type of liver disease and is a term that describes a spectrum of hepatic abnormalities characterized primarily by TG accumulation in the liver or hepatic steatosis (1). Hepatic lipid accumulation results from an imbalance between lipid acquisition (from adipose tissue-derived fatty acids and de novo lipogenesis) and lipid disposal (lipid oxidation and TG-rich lipoprotein secretion) (2,3). Several lines of evidence indicate that hepatic TG accumulation is a causative factor involved in hepatic insulin resistance and low concentrations of adiponectin, an antiinflammatory cytokine (4). In hepatic steatosis, the accumulation of lipids in the liver and the presence of reactive oxygen species (ROS) promote lipid peroxidation, the release of inflammatory cytokines, the activation of hepatic stellate cells, and impaired mitochondrial function. The latter further increases ROS generation (5), consequently producing oxidative stress, which in turn could lead to the progression of NAFLD to nonalcoholic steatohepatitis.

There is currently no successful drug therapy to treat hepatic steatosis (6) and lifestyle changes are considered to be the best approach in managing the disease. Several dietary strategies, including increased consumption of vitamin E, betaine, zinc, and

¹ Supported in part by Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología del D.F. grant PICDS08-6 (N.T.) and Grupo Produce del D.F. (N.T.), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica IN201910 (J.P.-C.) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 129838 (J.P.-C.). S.M.-R. and A.A.-N. received scholarships from CONACYT.

² Author disclosures: S. Morán-Ramos, A. Avila-Nava, A. R. Tovar, J. Pedraza-Chaverri, P. López-Romero, and N. Torres, no conflicts of interest.

³ Supplemental Table 1 is available from the "Online Supporting Material" link in the online posting of the article and from the same link in the online table of contents at <http://jn.nutrition.org>.

⁷ Abbreviations used: AKT, protein kinase B; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; CAT, catalase; CPT-1, carnitine palmitoyltransferase-1; C-FD, control feed-deprived; C-RF, control refed; FAS, fatty acid synthase; GPX, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; IRS, insulin receptor substrate; MDA, malondialdehyde; MTTP, microsomal triglyceride transfer protein; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor α ; PLTP, phospholipid transfer protein; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; SREBP-1c, sterol regulatory element binding protein-1c.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: nimbester@gmail.com.

soy protein, have been shown to improve hepatic steatosis and biomarkers of liver injury in animal models and in humans (7,8). Thus, dietary intervention is considered to be one of the best strategies in reducing fatty liver disease.

The use of specific functional foods, alone or in combination, has been tailored in order to ameliorate disease-specific biochemical abnormalities. Recently, we showed that the consumption of a diet containing nopal reduces serum TG, C-reactive protein, and glucose intolerance and increases serum adiponectin concentrations in subjects with metabolic syndrome (9). Nopal is a cactus plant that is widely consumed in the Mexican diet. It has a low glycemic index and is considered a functional food because of its high dietary fiber and polyphenol concentration as well as its antioxidant activity (10–12). However, it is unknown whether the consumption of nopal can reduce hepatic steatosis. Thus, the purpose of the present study was to assess the effect of long-term nopal consumption on the development of hepatic steatosis and the regulation of genes involved in lipid metabolism, oxidative stress, and insulin signaling in the liver of Zucker (*fa/fa*) rats. The obese Zucker rat is a spontaneous genetic obese model that exhibits hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and increased oxidative stress in the liver (13,14), which can provide evidence of the possible metabolic consequences of chronic nopal consumption.

Materials and Methods

Diets. Diets were administered in dry form. The control diet was prepared according to the recommendations of the AIN-93 (15). The experimental diet, C-4% Nopal, was formulated to provide 4% of dietary fiber from nopal in place of cellulose. The carbohydrate and protein content of the dehydrated nopal replaced maltodextrin and casein in the control diet, respectively (Supplemental Table 1). Nopal cladodes were obtained from Milpa Alta and were dehydrated at 50°C for 24–36 h. The chemical composition of dehydrated nopal was measured according to AOAC methods (16), and results are summarized in Table 1.

Rats. Seven-week-old male obese Zucker (*fa/fa*) rats ($n = 24$) were housed in individual wire-bottomed cages and maintained in a temperature-controlled room with 12-h light-dark cycles and free access to water. Rats ($n = 12$ /group) were divided into 2 groups to consume either the control or nopal diet for 7 wk. Feed intake and body weight were recorded every other day. To study the long-term effect of the consumption of the nopal diet as well as the metabolic response to these diets, each group was divided into 2 subgroups on the last day of the study. Half of the rats in each group were killed after 9 h of feed deprivation [control feed-deprived (C-FD) and nopal feed-deprived (N-FD)] and half were refed by allowing them access to their feed for 2 h [control refed (C-RF) and nopal refed (N-RF)]. All of the rats were killed by decapitation after being anesthetized with CO₂; the liver was rapidly removed and weighed, and a sample was snap-frozen and stored at –70°C until analysis. Another liver tissue

TABLE 1 Chemical composition of the dehydrated nopal

Component	Values
	<i>g/100 g</i>
Water	4
Ash	14
Protein	20
Lipids	ND ¹
Soluble fiber	33
Insoluble fiber	6
Carbohydrates	23

¹ ND, not detected when values were less than the limit of detection. The limit of detection for this method was 0.38%.

sample was taken and fixed in formalin for hematoxylin-and-eosin staining. Serum was obtained by centrifugation of blood at 1500 × *g* for 10 min and stored at –70°C until further analysis. All of the procedures were approved by the Animal Committee of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition, Mexico City.

Biochemical variables. Serum insulin and adiponectin were determined by ELISA kits (Alpco Diagnostics). Serum glucagon was measured by using the Glucagon RIA kit (Millipore). Serum glucose was measured with the YSI select 2700 Biochemistry Analyzer (YSI Incorporated). Serum TG, cholesterol, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) were measured by using an enzymatic-photometric assay kit (Diasys Diagnostics Systems GmbH). The serum FFA concentration was assayed with a Free Fatty Acids Half Micro test (Roche Applied Science).

The total number of lipoprotein particles and the different subclasses of VLDL and LDL were measured in the FD groups by using the NMR method as previously described (17). All of the NMR spectroscopy measurements were performed at LipoScience, Inc., in freshly thawed frozen pooled serum samples (5–6 rats/group).

Histologic analysis and liver lipids. Liver sections, 4- μ m thick, were stained with hematoxylin and eosin. A morphologic analysis of liver tissue was performed by using the Leica Qwin image-analyzer system on a Leica DMLS microscope. Total lipids were extracted as previously described (18), with modifications (19).

Intestinal lipid absorption. Lipid absorption was measured in a different group of Zucker rats previously fed a 20% casein diet (15). After 14 h of feed deprivation, basal blood samples were collected and followed by an i.p. injection of poloxamer 407 (150 g/L in saline, 1 g/kg body weight; P-407; Sigma-Aldrich Co.) to inhibit lipoprotein lipase. One hour later, an i.g. gavage of nopal or cellulose (1 mL of a 40-g/L solution) was administered followed by a soy oil bolus (1 μ L/g body weight). Blood was collected at 1-h intervals until 5 h after gavage.

Determination of lipid peroxidation, ROS, and serum antioxidant activity. The formation of ROS in liver and malondialdehyde (MDA) in the liver and serum was estimated according to a previous report (20), and serum antioxidant activity was measured by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method (21).

Hepatic enzymatic antioxidant activity. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), and glutathione reductase (GR) activities were measured in liver homogenates by using spectrophotometry (22). Activity was expressed as U/mg protein, where U is the amount of enzyme that catalyzes the conversion of 1 μ mol of substrate in 1 min.

Quantitative real-time PCR. Total RNA was isolated from tissues by using guanidine thiocyanate (23). The total amount of RNA was subjected to reverse transcription prior to PCR amplification. TaqMan fluorogenic probes and oligonucleotide primers for peroxisome proliferator activated receptor- α (*Ppara*); *Rn00566193_m1*, carnitine palmitoyltransferase-1 (*Cpt1*); *Rn00580702_m1*, acyl-CoA oxidase1 (*Aox*); *Rn00569216_m1*, sterol regulatory element-binding protein-1c (*Srebp1c*); *Rn01495769_m1*, acetyl-CoA carboxylase 1 (*Acc1*); *Rn00588290_m1*, fatty acid synthase (*Fas*); *Rn00569119_m1*, microsomal TG transfer protein (*Mttp*); *Rn01522970_m1*, phospholipid transfer protein (*Pltp*); *Rn01423343_m1*, catalase (*Cat*); *Rn00560930_m1*, superoxide dismutase 1 (*Sod1*); *Rn0566938_m1*, superoxide dismutase 2 (*Sod2*); *Rn99999088_g1*, glutathione reductase (*Gr*); *Rn00588153_m1*, and glutathione peroxidase (*Gpx*); *Rn00577994_m1* were obtained from Applied Biosystems. TaqMan PCR assays for each target gene were analyzed in triplicate in a 96-well assay plate with an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems). The relative amounts of mRNA were calculated by using the $\Delta\Delta$ Ct method with an efficiency adjustment according to the Pfaffl equation (24). Actin was used as the invariant control.

Western-blotting analysis. Liver extract was obtained as previously described (25), and the protein concentration of each extract was determined by the Bradford assay (Bio-Rad) and stored at –70°C. Protein detection was

performed by Western blotting, and the primary antibodies used included anti-CPT1, which was kindly donated by Dr. V. Esser (26), anti-MTTP, anti-SREBP-1c, anti-AKT and anti-phosphorylated AKT (Ser⁴⁷³) (Santa Cruz Biotechnology), and anti-ACC, anti-phospho-ACC (Ser⁷⁶), anti-insulin receptor substrate (IRS) 1 and anti-phospho-IRS (Tyr⁹⁴¹) (Millipore). β -Actin and γ -tubulin (Santa Cruz Biotechnology) were used as loading controls. Protein bands were quantified by using the NIH software Image J.

Statistical analysis. Values are expressed as means \pm SEM. Data were assessed by using the Kolmogorov-Smirnov Z test to examine the distribution type; if data did not exhibit a normal distribution, they were logarithmically transformed prior to analysis. The data were analyzed by using GraphPad Prism (version 5.03; Graph Pad Software, Inc.). Differences were considered significant when $P < 0.05$. Two-way ANOVA was used to determine the main effects of diet (control vs. nopal) and physiologic state (feed-deprived vs. refed) and their interaction. When main effects of diet or physiologic state were found and there was no significant interaction effect, data were pooled (by diet or physiologic effect) and Bonferroni post hoc pairwise analysis was performed. When a significant interaction effect was found, differences between all 4 groups were determined by using Tukey's test. No statistical analysis was performed on lipoprotein particles data because values represent the measurements of pooled samples (5–6 rats).

Results

Weight gain and feed intake. The mean daily feed intake was significantly higher for the nopal groups compared with the control groups. However, no difference in weight gain between the groups was observed (Table 2).

Serum biochemical variables. Glucose concentration was not significantly different between rats fed the control and nopal diets. Serum FFA concentration was lower in both RF groups than in the FD groups; however, diet had no effect (Table 2). Glucagon concentration was higher in the RF than in the FD group; however, diet had no effect. TG concentration did not differ between the C-FD and N-FD groups but was greater in the N-RF than in the C-RF group ($P < 0.01$). Nopal-fed rats had significantly lower ($\sim 30\%$) serum total cholesterol concentrations than did control-fed rats (Table 2).

Hepatic histologic analysis. A histologic analysis of livers by using hematoxylin-and-eosin staining showed severe hepatic steatosis in the control groups (C-FD and C-RF), which was characterized by

the excessive accumulation of fat in hepatic intracellular vesicles that affected a large number of hepatocytes. In contrast, the nopal groups (N-FD and N-RF) showed a lower lipid droplet content than did their corresponding control groups (Fig. 1A).

Liver lipids and serum transaminases. To evaluate the effect of nopal consumption on hepatic steatosis, we first assessed the liver:body weight ratio of Zucker rats. The greater ratio in both control groups is characteristic of the development of hepatomegaly reported in this model (27). In contrast, the relative liver weight of the nopal groups was 20% lower than that of the control groups (Fig. 1B). In addition, nopal groups had a dramatically lower hepatic TG concentration than did the control groups (Fig. 1C). The hepatic TG concentration was 40% lower in the N-FD group and 60% lower in the N-RF group than in the C-FD and C-RF groups, respectively, whereas no difference was observed in hepatic cholesterol concentration (Table 2). Considering the significant decrease in the development of hepatic steatosis in the nopal groups, we investigated the impact of nopal on liver injury biomarkers. Serum ALT and AST activities were significantly lower in the nopal groups than in the control groups ($P = 0.036$ and <0.01 respectively); however, there was no effect of physiologic state (Table 2).

Lipoprotein particles. Total VLDL particles (TG-rich particles) were higher in the N-FD group than in the C-FD group (Fig. 2A). In contrast, total LDL particles and their different subclasses were lower in the N-FD group than in the C-FD group (Fig. 2B).

Lipid absorption after acute consumption of nopal. Due to the content of the dietary fiber present in nopal, we assessed the effect of nopal consumption on lipid absorption. As shown in Fig. 2C, there were no differences between the nopal bolus when compared with the soy oil alone, and this response was similar to the one produced by cellulose.

Hepatic gene expression and protein production of transcription factors and enzymes involved in lipid metabolism. We examined the expression of genes and proteins involved in lipid metabolism to understand the possible mechanism by which nopal lowers the development of hepatic steatosis. The genes involved in hepatic fatty acid oxidation such as transcription factor (*Ppara*), and its target genes *Cpt1* and

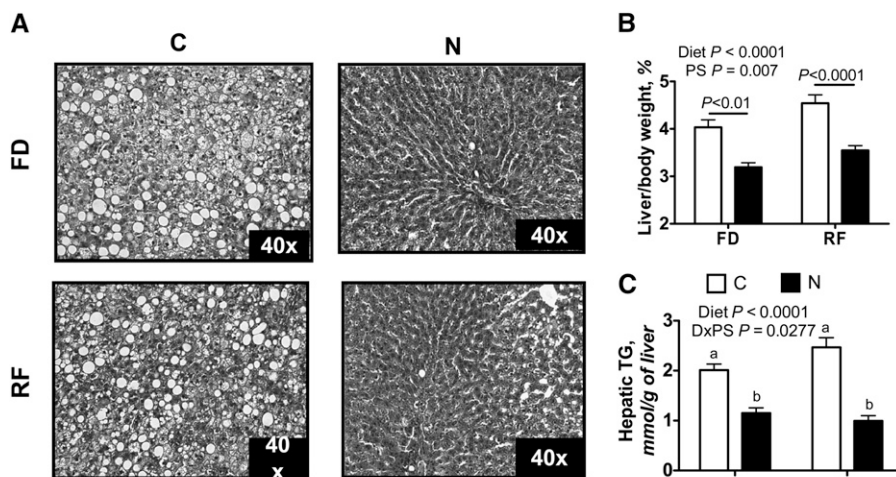
TABLE 2 Biochemical and anthropometric variables of Zucker (*fa/fa*) rats fed with C or N diets for 7 wk and that were or were not refed after 9 h of feed deprivation¹

	FD		RF		P value		P-interaction
	C-FD	N-FD	C-RF	N-RF	D	PS	D \times PS ²
Food intake, g/d	23.8 \pm 0.2	25.5 \pm 0.3*	23.9 \pm 0.3	24.4 \pm 0.4*	<0.01	NS	NS
Net weight gain, g	317 \pm 11	319 \pm 12	332 \pm 14	316 \pm 9	NS	NS	NS
Serum glucose, mmol/L	7.4 \pm 0.7	8.0 \pm 0.3	9.1 \pm 0.8	8.3 \pm 0.5	NS	NS	NS
Serum glucagon, ng/L	80 \pm 3 ^b	85 \pm 10 ^{a,b}	123 \pm 5 ^a	100 \pm 6 ^{a,b}	NS	0.0001	<0.05
Serum FFA, mmol/L	0.92 \pm 0.06	0.82 \pm 0.08	0.39 \pm 0.05**	0.41 \pm 0.05**	NS	<0.0001	NS
Serum TG, mmol/L	2.8 \pm 0.3 ^b	2.9 \pm 0.1 ^b	3.0 \pm 0.2 ^b	4.7 \pm 0.3 ^a	0.001	<0.001	<0.01
Serum cholesterol, mmol/L	6.8 \pm 0.4	4.5 \pm 0.4*	7.0 \pm 0.3	4.8 \pm 0.3*	<0.001	NS	NS
Serum ALT activity, U/L	105 \pm 14	76 \pm 8*	132 \pm 30	74 \pm 10	0.036	NS	NS
Serum AST activity, U/L	300 \pm 27	201 \pm 25*	345 \pm 51	240 \pm 20*	<0.01	NS	NS
Liver total cholesterol, mmol/g liver	0.12 \pm 0.01 ^{a,b}	0.15 \pm 0.01 ^a	0.14 \pm 0.01 ^a	0.10 \pm 0.02 ^b	NS	NS	<0.01

¹ Values are means \pm SEM, $n = 5-6$. Means in a row without a common letter differ, $P < 0.05$. *Different from corresponding C groups, $P < 0.05$; **different from corresponding FD groups, $P < 0.05$. ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; C, control; C-FD, control feed-deprived; C-RF, control refed; D, diet; FD, 9 h of feed deprivation; N, nopal (C-4% Nopal); N-FD, nopal-feed deprived; N-RF, nopal refed; PS, physiologic state; RF, refed.

² Differences are based on 2-way ANOVA. Bonferroni correction was used as post hoc analysis.

FIGURE 1 Fat deposition (A), relative weight (B), and TG concentration (C) in livers of Zucker (*fa/fa*) rats fed the C or N diet for 7 wk and that were or were not refed after 9 h of feed deprivation. Values are means \pm SEM, $n = 5-6$. Labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$. C, control; D, diet; FD, 9 h of feed deprivation; N, nopal (C-4% Nopal); PS, physiologic state; RF, refed.



Aox, were significantly upregulated in the N-FD group compared with the C-FD group. Furthermore, *Cpt1* was also upregulated in the N-RF group compared with the C-RF group (Table 3). Consequently, CPT-1 protein abundance in livers (Table 3) of the N-FD group was higher than in the C-FD group; however, diet had no effect in the refed state.

Although the mRNA abundance of *Acc1* was higher in the N-FD group than in the C-FD group, the mRNA abundance of *Srebp1c* and *Fas* did not change, which suggested that there was no significant increase in lipogenesis in the nopal group in the feed-deprived state. In contrast, the N-RF group showed a greater expression of these genes compared with the C-RF group; however, these changes did not translate into equivalent variations in the abundance of these lipogenic proteins. In addition, the phosphorylation of ACC, which is the inactive form, increased in the N-RF group when compared with the C-RF group, which suggested a partially inactive enzyme (Table 3).

In addition, we assessed whether the consumption of nopal lowered hepatic fat accumulation by modifying the expression of genes involved in TG and phospholipid mobilization into the circulation. Thus, we measured the expression of MTTP and the PLTP, which are proteins involved in the transference of TG and phospholipids to synthesize hepatic TG-rich lipoproteins. *Mttp* gene expression was significantly greater in the N-FD group than in the C-FD group (Table 3). Inversely, in the refed state, the gene expression of *Mttp* in the N-RF group was significantly lower than in the C-RF group. *Mttp* gene expression was accompanied by greater MTTP in the N-FD group than in the C-FD group, whereas no difference was observed in the refed state (Table 3). *Pltp* gene expression followed a pattern similar to *Mttp* but to a lesser extent.

Nopal consumption decreased oxidative stress and lipid peroxidation. The biomarkers of oxidative stress were measured to assess the antioxidant capacity of nopal in the liver. ROS were significantly higher ($P = 0.04$) in the C-FD group than in the N-FD group, whereas in the refed state, ROS concentration was lower in both diet groups (Fig. 3A). Liver MDA, a product of lipid peroxidation, was a 76% lower in the N-FD group and 93% lower in the N-RF group compared with the C-FD and C-RF groups respectively (Fig. 3B).

To test whether the improvement in the oxidative stress biomarkers was due to a modulation of antioxidant enzymes, the activity and expression of genes involved in the antioxidant capacity, such as *Gr*, *Gpx*, *Sod1*, *Sod2*, and *Cat*, were measured in liver samples. The mRNA abundance of only *Sod1* was significantly higher in the nopal group in both physiologic states (Supplemental Table 2). In addition, the activity of GR and GPX enzymes in liver showed no difference between the control and nopal groups (Supplemental Table 2). In contrast, CAT and total SOD activities were lower in the nopal groups in the feed-

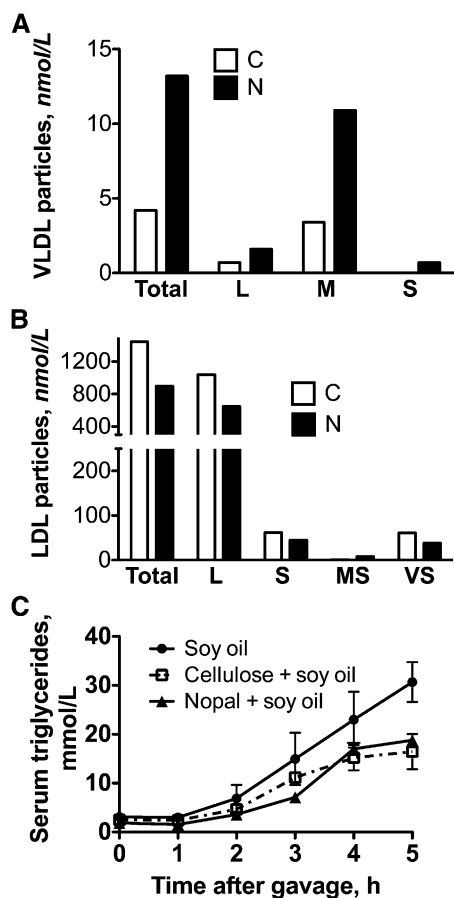


FIGURE 2 Feed-deprived total VLDL particles in Zucker (*fa/fa*) rats fed the C or the N diet for 7 wk with their different subclasses: large (L), medium (M), small (S) (A). Total LDL particles and their different subclasses: large (L), small (S), medium small (MS), very small (VS) (B). The effect of nopal on the rate of TG appearance after a lipid gavage (C). Values represent the means \pm SEM for 3 rats. C, control; N, N, nopal (C-4% Nopal).

TABLE 3 mRNA, protein expression, and phosphorylation of enzymes involved in lipid metabolism in livers of Zucker (*fa/fa*) rats fed with C or N diets for 7 wk and that were or were not refed after 9 h of feed deprivation¹

	FD		RF		P value ²		P-interaction
	C-FD	N-FD	C-Rf	N-RF	D	PS	D × PS
Fatty acid oxidation							
<i>Pparα</i> , relative mRNA	1.02 ± 0.15	1.70 ± 0.10*	0.75 ± 0.07**	1.07 ± 0.02**	<0.01	<0.01	NS
<i>Cpt1</i> , relative mRNA	1.02 ± 0.12 ^b	1.89 ± 0.08 ^a	0.64 ± 0.04 ^c	1.82 ± 0.07 ^a	<0.0001	<0.05	<0.05
<i>Acox</i> , relative mRNA	1.01 ± 0.12 ^b	1.93 ± 0.09 ^a	1.05 ± 0.04 ^b	1.36 ± 0.06 ^b	<0.01	NS	<0.01
CPT-1, protein abundance	1.00 ± 0.00	2.19 ± 0.38*	2.13 ± 0.31	2.19 ± 0.33	<0.05	NS	NS
Fatty acid synthesis							
<i>Srebp1c</i> , relative mRNA	1.01 ± 0.09 ^c	1.04 ± 0.08 ^c	1.65 ± 0.09 ^b	2.69 ± 0.15 ^a	<0.01	<0.0001	<0.05
<i>Acc1</i> , relative mRNA	1.02 ± 0.13 ^c	2.44 ± 0.07 ^b	3.00 ± 0.18 ^b	4.67 ± 0.15 ^a	<0.0001	<0.0001	<0.05
<i>Fas</i> , relative mRNA	1.01 ± 0.07	1.09 ± 0.06	2.17 ± 0.10	2.63 ± 0.16	NS	<0.0001	NS
SREBP-1c, protein abundance	1.00 ± 0.00 ^{a,b}	0.97 ± 0.14 ^{a,b}	0.75 ± 0.11 ^b	1.38 ± 0.19 ^a	<0.05	NS	<0.05
pACC/ACC, AU	1.00 ± 0.00	1.25 ± 0.08	1.74 ± 0.20	2.72 ± 0.82	NS	NS	NS
FAS, protein abundance	1.00 ± 0.00	1.07 ± 0.10	0.93 ± 0.10	1.26 ± 0.29	NS	NS	NS
Fatty acid export							
<i>Mttp</i> , relative mRNA	1.01 ± 0.08 ^c	2.76 ± 0.14 ^a	2.28 ± 0.02 ^a	1.74 ± 0.11 ^b	<0.01	<0.05	<0.0001
<i>Pltp</i> , relative mRNA	1.01 ± 0.07 ^b	1.29 ± 0.03 ^a	1.16 ± 0.08 ^{a,b}	1.12 ± 0.05 ^{a,b}	NS	NS	<0.05
MTTP, protein abundance	1.00 ± 0.00	2.19 ± 0.38*	2.13 ± 0.31	2.19 ± 0.30	<0.05	NS	NS

¹ Values are means ± SEM, *n* = 5–6. Means in a row without a common letter differ, *P* < 0.05. *Different from corresponding C groups, *P* < 0.05; **different from corresponding FD groups, *P* < 0.05. ACC, acetyl-CoA carboxylase; AU, arbitrary units; C, control; C-FD, control feed-deprived; CPT-1, carnitine palmitoyltransferase 1; C-RF, control refed; D, diet; FAS, fatty acid synthase; FD, 9 h of feed deprivation; MTTP, microsomal TG transfer protein; N, nopal (C-4% Nopal); N-FD, nopal-feed deprived; N-RF, nopal refed; pACC, phosphorylated acetyl-CoA carboxylase; PS, physiologic state; RF, refed; SREBP-1c, sterol regulatory element binding protein-1c.

² Differences are based on 2-way ANOVA. Bonferroni correction was used as post hoc analysis.

deprived and refed states. The latter may suggest that the improvement in the antioxidant status, as evaluated by MDA and ROS concentrations, was not associated with an increase in the gene expression of antioxidant enzymes.

To evaluate whether the improvement in oxidative stress extended beyond the liver, the antioxidant capacity and lipid

peroxidation in the serum were also measured. There was no change in the antioxidant capacity in the serum of the nopal groups in either of the physiologic states (Supplemental Table 2). However, MDA concentration was 31% lower in the N-FD group and 46% lower in the N-RF group compared with the C-FD and N-FD groups, respectively, reflecting lower serum lipid peroxidation in nopal-fed rats (Supplemental Table 2).

Insulin signaling and adiponectin concentration. Although the control and nopal groups developed the characteristic hyperinsulinemia of this obesity model (28), the N-RF group showed a significantly lower insulin concentration than did the C-RF group (Fig. 4A). To evaluate whether the decrease in postprandial insulin concentration was accompanied by an improvement in liver insulin signaling, IRS1 phosphorylation (tyr⁹⁴¹) and AKT phosphorylation (ser⁴⁷³) were measured in the liver. IRS1 and AKT phosphorylation was significantly greater in the N-RF group than in the C-RF group, whereas no difference was observed in the feed-deprived state (Fig. 4C, D).

Finally, the nopal group showed a significantly greater total adiponectin concentration in both physiologic states compared with the control groups. Total adiponectin concentration was 43% higher in the N-FD group and 75% higher in the N-RF group than in the C-FD and C-RF groups, respectively (Fig. 4B).

Discussion

Hepatic steatosis is most commonly associated with obesity, insulin resistance (29), and hyperlipidemia. The only safe way to reduce hepatic steatosis is by changes in lifestyle, such as diet and exercise, which are not always as easy to adhere to. Therefore, a need exists for effective dietary strategies for the control of hepatic steatosis. We have shown that the combination of functional foods, including nopal, reduces insulin resistance and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome (9).

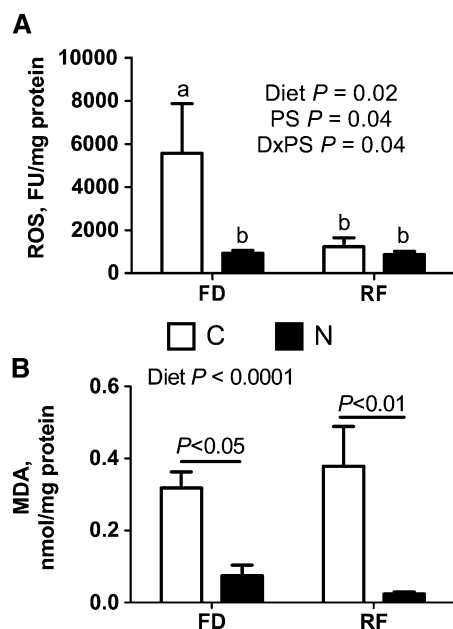


FIGURE 3 Hepatic ROS (A) and MDA (B) concentrations in Zucker (*fa/fa*) rats fed the C or N diet for 7 wk and that were or were not refed after 9 h of feed deprivation. Values are means ± SEM, *n* = 5–6. Labeled means without a common letter differ, *P* < 0.05. C, control; D, diet; FD, 9 h of feed deprivation; MDA, malondialdehyde; N, nopal (C-4% Nopal); PS, physiologic state; RF, refed; ROS, reactive oxygen species.

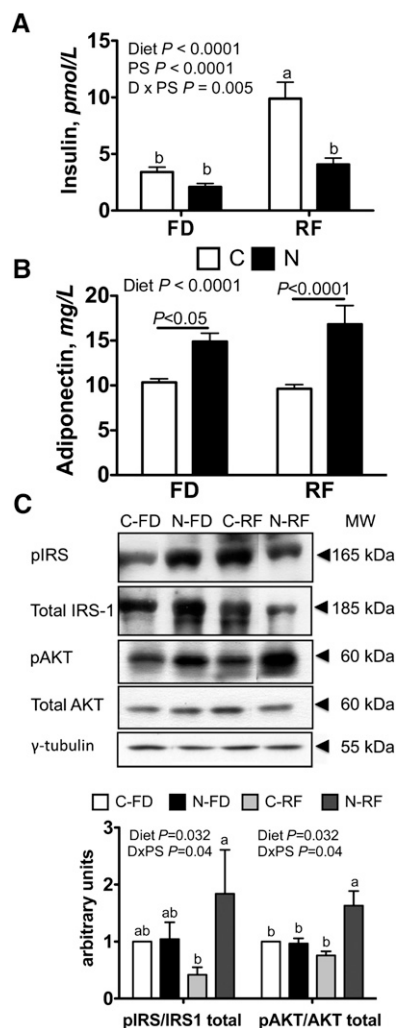


FIGURE 4 Serum insulin (A) and adiponectin (B) concentrations and phosphorylation of proteins involved in liver insulin signaling (C) and densitometric analysis (D) in Zucker (*fa/fa*) rats fed the C or N diet for 7 wk and that were or were not refed after 9 h of feed deprivation. Values are means \pm SEM, $n = 5-6$. Labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$. AKT, protein kinase B; C, control; D, diet; FD, 9 h of feed deprivation; IRS-1, insulin receptor substrate 1; N, nopal (C-4% Nopal); pAKT, phosphorylated AKT; pIRS, phosphorylated IRS; PS, physiologic state; RF, refed.

In this study, our results showed that the dietary strategy of using nopal remarkably attenuated TG accumulation in the liver, even though the Zucker rats developed hyperinsulinemia (Fig. 1). This beneficial effect was accompanied by a reduction in hepatic oxidative stress and in biomarkers of hepatic injury such as ALT and AST. This attenuation of hepatic steatosis may include different possible mechanisms as follows:

1) Via adiponectin. Adiponectin is an antiinflammatory adipocytokine that limits fat accumulation in the liver by activation of PPAR α (30). There was a significantly higher serum adiponectin concentration in nopal groups compared with control groups (Fig. 4B), which, in turn, reestablished *Ppara*, *Cpt-1*, and *Aox* gene expression in the feed-deprived state (Table 3). These results were consistent with greater CPT-1 protein concentration, which likely reflects an increase in the capacity of fatty acid oxidation, preventing the accumulation of TG in the liver (Fig. 1).

2) By a decrease in oxidative stress. During the development of NAFLD, there is an increased production of ROS, often leading to greater hepatic lipid peroxidation (31). However, the presence of different polyphenols such as isorhamnetin and kaempferol as both aglycones and glycosides in different varieties of Mexican cactus (*Opuntia* spp) has been shown to have antioxidant activity (32). Our results showed that long-term consumption of nopal significantly lowered liver MDA concentrations, a biomarker of lipid peroxidation, which could be attributed to the lower concentrations of ROS in the liver (Fig. 3A). It is known that the scavenging of ROS in cells can occur by increasing the capacity of antioxidant enzymes or by the presence of compounds that directly trap ROS. Our results showed that activity of antioxidant enzymes did not change among groups, suggesting that attenuation of the oxidative stress present in nopal-fed rats is likely due to a direct interaction between antioxidant molecules present in nopal (33) and the reactive species. However, oxidative stress plays an important role in the regulation of VLDL secretion. Lipid peroxidation induces the proteolysis of apo B-100 particles, and oxidative stress reduces *Mttp* mRNA expression, resulting in the inhibition of VLDL secretion (34). Our results showed that gene expression of *Mttp* and the concentration of VLDL particles were greater in the nopal groups than in the control groups. The latter may suggest that there is an enhanced exportation of TG from the liver into the circulation, thus preventing the accumulation of TG in the liver. Despite the excess serum lipids, our results showed significantly lower MDA concentrations, a biomarker of lipid peroxidation, in the serum of the N-RF group compared with the C-RF group (Supplemental Table 2). In addition, the nopal group showed a lower serum total cholesterol concentration and fewer LDL particles than the control group (Fig. 2B). Thus, it is possible to suggest that these 2 findings may outweigh the possible risk of atherosclerosis due to the greater number of VLDL particles.

3) By improving hepatic insulin signaling. The third possible mechanism by which nopal may have attenuated hepatic steatosis is by an improvement in hepatic insulin signaling, which is implicated in reducing insulin resistance. There is evidence that suggests that an improvement in hepatic insulin sensitivity is associated with a reduction of hepatic steatosis. Although Zucker rats develop insulin resistance at wk 7 (35), the hyperinsulinemia in the nopal group was significantly lower compared with the control group in the refed state (Fig. 4), and this was accompanied by an improvement in the insulin signaling mediated via IRS-1 and AKT (Fig. 4C), which could explain the attenuation in hepatic steatosis. It is likely that the presence of hyperinsulinemia in this model and the improved insulin signaling activity led to a greater hepatic expression of the transcription factor SREBP-1c in the nopal group compared with the control group in the refed state, which is known to activate the transcription of many genes involved in fatty acid synthesis. In spite of the increase in the lipogenic genes, given the increase in fatty acid oxidation mediated by PPAR α , the deleterious effect of the induction of SREBP-1c was partially abolished, which prevented lipid accumulation in the liver.

It is worth mentioning that other bioactive components in nopal, such as dietary fiber, may also be involved. Different types of dietary fiber have been shown to modify lipid absorption in the intestine (36). Even though the low dose of nopal in the bolus showed no effect on lipid absorption compared with cellulose in this study, the effects of dietary fiber on lipid metabolism and hepatic steatosis go beyond modification of lipid absorption. Short-chain fatty acids produced by intestinal fermentation of soluble fibers have been shown to modify hepatic lipid synthesis as well as improve intestinal permeability, thus improving biomarkers of NAFLD (37). Nopal contains soluble and insoluble fiber (12); therefore, it is possible to speculate that other mechanisms associated with the dietary fiber present in nopal are involved in the reduction in hepatic steatosis. This needs further research.

The results reported here show that long-term consumption of nopal has a beneficial effect on the liver of obese Zucker rats by reducing steatosis and oxidative stress, improving insulin signaling, decreasing various serum biomarkers of hepatic injury (ALT, AST), and increasing serum adiponectin, therefore attenuating liver damage.

A possible limitation of this study is that the obese Zucker (*fa/fa*) rat model does not fully mirror the development and progression of NAFLD in humans. However, this model mimics the hepatic pathology, oxidative stress, and deregulated metabolism that are observed in humans with NAFLD (38). Thus, given these results, it is logical to focus on both preventing and reversing oxidative stress and insulin resistance by potential dietary therapeutic approaches to reduce NAFLD. Although further studies in humans are needed, the use of nopal as a functional food can be easily introduced as a dietary strategy to ameliorate the abnormalities occurring in individuals with NAFLD, especially in the Hispanic population, in which hepatic steatosis is highly prevalent (1).

Acknowledgments

N.T., A.R.T., and S.M.-R. designed the research; S.M.-R., A.A.-N., and P.L.-R. conducted the research; N.T., A.R.T., A.A.-N., J.P.-C., and S.M.-R. analyzed the data; and N.T., A.R.T., S.M.-R., and A.A.-N. wrote the manuscript. N.T. had primary responsibility for the final content of the manuscript. All of the authors read and approved the final manuscript.

Literature Cited

- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40:1387–95.
- Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011;332:1519–23.
- Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res*. 2009;48:1–26.
- Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006;116:1784–92.
- Ludwig J, McGill DB, Lindor KD. Review: nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997;12:398–403.
- Dowman JK, Armstrong MJ, Tomlinson JW, Newsome PN. Current therapeutic strategies in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab*. 2011;13:692–702.
- Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, McClain C. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem*. 2007;18:184–95.
- Tovar AR, Torre-Villalvazo I, Ochoa M, Elias AL, Ortiz V, Aguilar-Salinas CA, Torres N. Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker *fa/fa* rats. *J Lipid Res*. 2005;46:1823–32.
- Guevara-Cruz M, Tovar AR, Aguilar-Salinas CA, Medina-Vera I, Gil-Zenteno L, Hernandez-Viveros I, Lopez-Romero P, Ordaz-Nava G, Canizales-Quinteros S, Guillen Pineda LE, et al. A dietary pattern including nopal, chia seed, soy protein, and oat reduces serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome. *J Nutr*. 2012;142:64–9.
- Ginestra G, Parker ML, Bennett RN, Robertson J, Mandalari G, Narbad A, Lo Curto RB, Bisignano G, Faulds CB, Waldron KW. Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *J Agric Food Chem*. 2009;57:10323–30.
- Medina-Torres L, Vernon-Carter EJ, Gallegos-Infante JA, Rocha-Guzman NE, Herrera-Valencia EE, Calderas F, Jimenez-Alvarado R. Study of the antioxidant properties of extracts obtained from nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes after convective drying. *J Sci Food Agric*. 2011;91:1001–5.
- Rodríguez-García ME, de Lira C, Hernández-Becerra E, Cornejo-Villegas MA, Palacios-Fonseca AJ, Rojas-Molina I, Reynoso R, Quintero LC, Del-Real A, Zepeda TA, et al. Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation. *Plant Foods Hum Nutr*. 2007;62:107–12.
- Serkova NJ, Jackman M, Brown JL, Liu T, Hirose R, Roberts JP, Maher JJ, Niemann CU. Metabolic profiling of livers and blood from obese Zucker rats. *J Hepatol*. 2006;44:956–62.
- Tomita K, Azuma T, Kitamura N, Tamiya G, Ando S, Nagata H, Kato S, Inokuchi S, Nishimura T, Ishii H, et al. Leptin deficiency enhances sensitivity to alcoholic steatohepatitis through suppression of metallothionein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287:G1078–85.
- Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr*. 1997;127(Suppl):838S–41S.
- Association of Official Analytical Chemists International. Official methods of analysis. 18th ed. Arlington (Va): AOAC International; 2010.
- Otvos JD. Measurement of lipoprotein subclass profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab*. 2002;48:171–80.
- Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest*. 1998;101:1354–61.
- Frigolet ME, Torres N, Uribe-Figueroa L, Rangel C, Jimenez-Sanchez G, Tovar AR. White adipose tissue genome wide-expression profiling and adipocyte metabolic functions after soy protein consumption in rats. *J Nutr Biochem*. 2011;22:118–29.
- Orozco-Ibarra M, Medina-Campos ON, Sanchez-Gonzalez DJ, Martinez-Martinez CM, Floriano-Sanchez E, Santamaria A, Ramirez V, Bobadilla NA, Pedraza-Chaverri J. Evaluation of oxidative stress in D-serine induced nephrotoxicity. *Toxicology*. 2007;229:123–35.
- Koren E, Kohen R, Ginsburg I. Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2010;235:689–99.
- Pérez-Rojas JM, Guerrero-Beltrán CE, Cruz C, Sanchez-Gonzalez DJ, Martínez-Martínez CM, Pedraza-Chaverri J. Preventive effect of tert-butylhydroquinone on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol*. 2011;49:2631–7.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156–9.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:e45.
- Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc*. 2007;2:287–95.
- Esser V, Kuwajima M, Britton CH, Krishnan K, Foster DW, McGarry JD. Inhibitors of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I limit the action of proteases on the enzyme: isolation and partial amino acid analysis of a truncated form of the rat liver isozyme. *J Biol Chem*. 1993;268:5810–6.
- Buqué X, Martínez MJ, Cano A, Miquilena-Colina ME, García-Monzón C, Aspichueta P, Ochoa B. A subset of dysregulated metabolic and survival genes is associated with severity of hepatic steatosis in obese Zucker rats. *J Lipid Res*. 2010;51:500–13.
- Aleixandre de Artiñano A, Miguel Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br J Nutr*. 2009;102:1246–53.

29. Utzschneider KM, Kahn SE. Review: the role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:4753–61.
30. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 2003;423:762–9.
31. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.* 2004;114:147–52.
32. Santos-Zea L, Gutierrez-Urbe JA, Serna-Saldivar SO. Comparative analyses of total phenols, antioxidant activity, and flavonol glycoside profile of cladode flours from different varieties of *Opuntia* spp. *J Agric Food Chem.* 2011;59:7054–61.
33. Stintzing FC, Carle R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry, technology, and uses. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49:175–94.
34. Pan M, Cederbaum AI, Zhang YL, Ginsberg HN, Williams KJ, Fisher EA. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *J Clin Invest.* 2004;113:1277–87.
35. Forcheron F, Abdallah P, Basset A, del Carmine P, Haffar G, Beylot M. Nonalcoholic hepatic steatosis in Zucker diabetic rats: spontaneous evolution and effects of metformin and fenofibrate. *Obesity (Silver Spring).* 2009;17:1381–9.
36. Vahouny GV, Satchithanandam S, Chen I, Tepper SA, Kritchevsky D, Lightfoot FG, Cassidy MM. Dietary fiber and intestinal adaptation: effects on lipid absorption and lymphatic transport in the rat. *Am J Clin Nutr.* 1988;47:201–6.
37. Parnell JA, Raman M, Rioux KP, Reimer RA. The potential role of prebiotic fibre for treatment and management of non-alcoholic fatty liver disease and associated obesity and insulin resistance. *Liver Int.* 2012;32:701–11.
38. Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis.* 2001;21:89–104.

Diet: Friend or Foe of Enteroendocrine Cells: How It Interacts with Enteroendocrine Cells^{1,2}

Sofia Moran-Ramos,^{3,4} Armando R. Tovar,³ and Nimbe Torres^{3*}

³Departamento de Fisiología de la Nutrición Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán," México, México City, México; and ⁴Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

ABSTRACT

Gut hormones play a key role in the regulation of food intake, energy expenditure, glucose homeostasis, lipid metabolism, and a wide range of metabolic functions in response to food ingestion. These hormones are altered in metabolic diseases, such as obesity and type 2 diabetes, and are thus proposed to be possible targets for the prevention or treatment of these diseases. It is clear that food composition, macronutrients, and other non-nutrient components as well as the physical properties of food not only modulate the secretion of gut peptides but also modulate transcription and enteroendocrine cell differentiation, which ultimately modifies gut hormone response. The specific mechanisms or sensing machinery that respond to the different components of the diet have been studied for many years; however, over the last few years, new molecular genetic techniques have led to important advances, thereby allowing a deeper understanding of these mechanisms. This review addresses the current knowledge regarding enteroendocrine cells and how diet interacts with this machinery to stimulate and regulate the secretion of gut peptides. The potential for diet interventions as a promising strategy for modulating gut hormone responses to food ingestion and, ultimately, preventing or treating metabolic diseases is being emphasized considering that these diseases are currently a public health burden. *Adv. Nutr.* 3: 8–20, 2012.

Introduction

In recent years, there has been an increasing awareness of the role of the gut (intestine) in metabolism. Gut cells are probably the first point of contact with ingested food; therefore, it is clear that they must prepare the organism for the nutrients that are entering the system. Of the cells that comprise the gut, there are many different subtypes of enteroendocrine cells. These cells have become increasingly more important over the past few years, because the production of their hormones plays a key role not only in the regulation of food intake but also in energy expenditure, glucose homeostasis, and a range of metabolic functions in response to food ingestion (1,2). For instance, some of these hormones, such as GLP-1,⁵ GIP, or PYY, seem to be altered in metabolic disease states such as obesity and type 2 diabetes (3,4). Whether this alteration is causal or is a consequence remains to be determined. In addition, dietary factors have

been shown to strongly influence the regulation of these peptides. Oligofructosaccharides, e.g., have been shown to mediate obesity-associated inflammation states in rodents via the modulation of gut hormones levels, such as GLP-2 (5). In the context of the recent epidemic of obesity and diet-related diseases, it is important to understand the nature of the different enteroendocrine cells and how diet interacts with them for the secretion and regulation of gut peptides.

The specific mechanisms underlying the sensing machinery that responds to different nutrients and non-nutrient components of the diet have been studied for many years; however, due to the dispersed nature of enteroendocrine cells as well as the inability to distinguish the different cell types morphologically for single cell analysis (6), the characterization of this machinery has been restricted to cell line models, which are not always accurate models of native enteroendocrine cells. However, over the past few years, new molecular genetic techniques, such as fluorescent protein expression in mice under the control of a promoter for a peptide hormone precursor, have enabled the *in vivo* identification, primary cell isolation, and culturing of each type of enteroendocrine cell. These techniques have also allowed the detection of proteins that could be involved in the sensing mechanisms and a deeper exploration of the

¹Supported by a CONACYT grant.

²Author disclosures: S. Moran-Ramos, A. Tovar, and N. Torres, no conflicts of interest.

⁵Abbreviations used: CaSR, calcium-sensing receptor; CCK, cholecystokinin; CCK1R, CCK 1 receptor; GIP, glucose-dependent insulinotropic peptide; GLP, glucagon-like peptide; GPR, G protein-coupled receptor; KATP, ATP-sensitive potassium; PYY, peptide tyrosine tyrosine; SGLT1, sodium-dependent glucose transporter.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: nimbester@gmail.com.

morphology of enteroendocrine cells. This characterization has led to important advances over the past years. Therefore, the purpose of this review is to focus on the current knowledge concerning enteroendocrine cells and how diet interacts with their machinery to stimulate and regulate the secretion of gut peptides.

Enteroendocrine cells

The intestinal surface has a unique architecture consisting of villus and crypt structures. The villus is a finger-like projection protruding into the lumen to increase the surface area of the small intestine by almost 30-fold (Fig. 1). Gut stem cells reside in crypts and are differentiated by notch signaling into absorptive enterocytes, paneth cells, goblet cells, tuft cells, and enteroendocrine cells (7,8). The latter are fully differentiated cells that, along with goblet and paneth cells, constitute the secretory cell types in the small intestine, whereas absorptive enterocytes comprise 90% of the epithelium (9).

With the exception of paneth cells, epithelial cell turnover occurs quite rapidly, with a lifespan of 3–5 d. This turnover occurs via exfoliation at the tips of the villi, i.e. the cells presumably undergo apoptosis and are extruded into the lumen in distinction to nondiffuse endocrine organs, perhaps suggesting more plasticity (10,11). Unlike many other endocrine cells that differentiate early in life and turn over slowly, enteroendocrine cells self-renew and differentiate from a large reservoir of stem cells throughout their lifespans (7).

Enteroendocrine cells are scattered throughout the intestinal tract and are embedded in a majority of nonendocrine cells, including absorptive enterocytes, goblet cells, and paneth cells. Although they represent ~1% of the epithelial cell population, they are considered the largest endocrine relative to the total numbers of cells (11,12). There are at least 15 subtypes of enteroendocrine cells that secrete a wide range of peptide hormones, which, in a complex manner,

control physiological and homeostatic functions in the digestive tract, particularly postprandial secretion and motility (13,14). A summary of some of the different enteroendocrine cell subtypes, secreted peptides, and their functions is provided in Table 1. Initially, these cells were classified primarily by their secreted peptide; however, it is now clear that some of these cells are able to secrete more than one hormone.

As summarized in Table 1, the primary functions of hormones secreted by the enteroendocrine cells are to coordinate the response of the gastrointestinal tract to food ingestion. Therefore, it has become clear that a key function of enteroendocrine cells is to act as sensors of luminal contents, thereby functioning as transepithelial signal transducers with their physicochemical signals, resulting in exocytosis of biological mediators into the circulation (11).

In terms of physiology, most enteroendocrine cells have been described as open cells with the ability to interact with luminal content. More recently, different transporters, such as SGLT1, taste receptors, and other GPR have been identified in some enteroendocrine cells as part of the machinery that interacts with chemical food components to trigger gut peptide release (15–18). In the context of the functions of gut peptides in satiety and metabolism as well as their alterations in obesity and metabolic-associated diseases, it is critical to understand how food components interact with enteroendocrine cells to regulate the secretion of these peptides. An understanding of this process could help with determining dietary strategies that modulate the secretion of these peptides. Such dietary modifications could be used as a preventive measure against or as a part of a treatment for metabolic diseases.

Due to the nature of the peptides that enteroendocrine cells secrete, the most studied cells are K, L, and I cells. Thus, this review will cover the characteristics and diet-cell interactions of these 3 cell types.

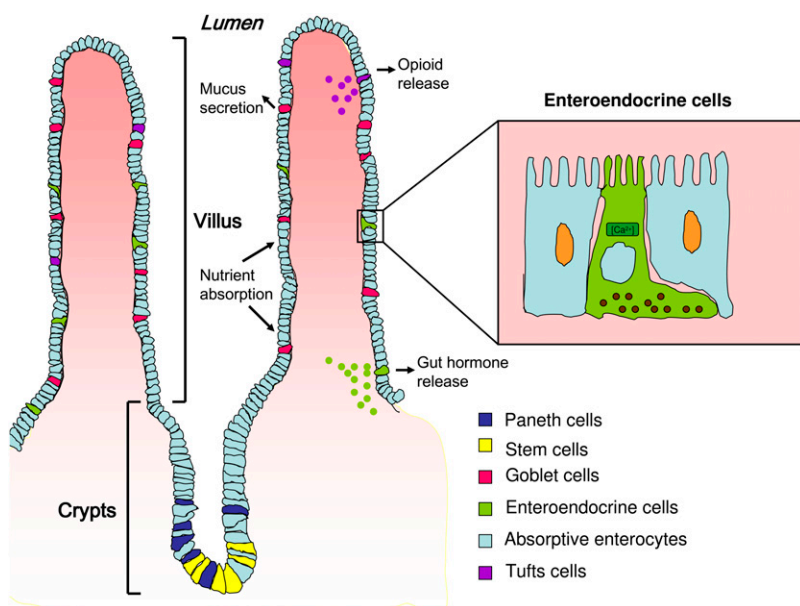


FIGURE 1 Small intestine morphology and distribution of epithelial cell types. Paneth and stem cells are localized in the crypts. Upon differentiation, enterocytes and goblet, enteroendocrine, and tuft cells migrate toward the villus. Enteroendocrine cells are scattered throughout the intestinal tract and are embedded primarily in enterocytes. Enteroendocrine cells release their contents via the basolateral surface upon interaction with food components.

TABLE 1 Summary of the different subset of enteroendocrine cells, localization, hormone secretion, and function

Cell	Localization	Peptide	Function
G cell	Pyloric antral part	Gastrin	Regulation of acid secretion
X or A like cells	Stomach	Ghrelin	Food intake stimulation
K cell	Proximal intestine	GIP ¹	Enhancement of insulin secretion and gastric acid secretion and reduction of LPL activity in adipose tissue
I cell	Proximal intestine	CCK	Gallbladder contraction, stimulation of pancreatic enzyme secretion, inhibition of food intake
S cell	Proximal intestine	Secretin	Stimulation of bicarbonate secretion and inhibition of gastric acid secretion, colonic contraction, and motility
M cell	Proximal intestine	Motilin	Gut motility
N cell	Distal intestine	Neurotensin	Gastric acid secretion, biliary secretion, and intestinal mucosal growth
L cell	Distal intestine and colon	PYY, GLP-1, GLP-2, glicentin	Inhibition of gastric acid secretion and gastric emptying and enhancement of insulin secretion

¹ CCK, cholecystokinin; GLP, glucagon-like peptide; GIP, glucose-dependent insulinotropic peptide; LPL, lipoprotein lipase; PYY, peptide tyrosine tyrosine.

K cells and GIP

K cell overview. After the conceptualization of the gut as an endocrine organ, Brown et al. (19) in 1971 purified a peptide capable of inhibiting gastric emptying and called it GIP. Later in 1973, Dupre et al. (20) determined that this peptide was also responsible for the enhancement of glucose-induced insulin secretion, the so-called incretin effect. GIP secretion was shown to be stimulated by ingestion of glucose and fat; however, the insulin response due to fat ingestion was observed only if glucose was also administered (20). The latter effect seems to be a safety mechanism for the inappropriate stimulation of insulin release in a high-fat, low-carbohydrate meal (10).

Localization. K cells were originally identified in the small intestine via their ultra-structural features. However, it was not until 1975 that Buffa et al. (21) showed that these K cells in the small intestine reacted to GIP antisera. The characteristic appearance of these cells was later described as intracellular secretory granules with a small electron-dense core surrounded by a concentric electron-lucent halo (10).

Similar to other enteroendocrine cells, K cells are scattered along the intestinal tract; however, the greatest density of K cells is found in the duodenal mucosa and has been estimated at 13/1000 epithelial cells (22). More recently, a subset of enteroendocrine cells coexpressing GIP and GLP-1 in the mid-intestine has been found and is typically referred to as K/L or L/K cells for convenience (22–25).

K cells are an open type of enteroendocrine cell with a connection to the gut lumen. The cell contains inner secretory granules where the gut peptide GIP is stored. Upon electrophysiological stimulation, these granules fuse with the basolateral membrane to release their contents.

GIP biological actions. Although the prime physiological role of GIP is to increase insulin secretion induced by intestinally absorbed nutrients, the GIP receptor has been found in different tissues, suggesting that it has variable extra-pancreatic functions. Indeed, it has been shown that GIP modulates calcium deposition in bone and bone formation (26,27) and has an important role in lipid metabolism. GIP

has been reported to stimulate fat deposition in adipocytes by increasing the activity of lipoprotein lipase (28–30). Moreover, high fat-fed and *ob/ob* mice that are knocked-out for the GIP receptor, although mildly glucose intolerant, were protected against obesity (31). In the same line, GIP receptor antagonism reversed obesity and metabolic-associated abnormalities in high fat-fed rats (32). These and other data suggest that GIP as is a metabolically thrifty gene and postulate it as possible link between overnutrition and obesity (31,33,34).

Diet effects and mechanisms. Fasting plasma concentrations of GIP are relatively low, with values of ~10 pmol/L. However, upon food ingestion, GIP concentration rises several-fold, usually within 10–20 min (10). The specific components responsible for the secretion of GIP are associated with the nature of the food composition. For example, GIP secretion is strongly stimulated by fat and carbohydrates, whereas proteins are less potent inducers of the hormone (35,36).

Dietary fat. Dietary fat is the most potent stimulus for GIP secretion (10). TG hydrolysis appears to be necessary for the induction of GIP secretion, because the ingestion of orlistat, an inhibitor of lipoprotein lipase, with a mixed meal significantly attenuated the GIP response (37). Moreover, the finding that olive oil induced a greater secretion of GIP in healthy participants compared to butter suggested that the fatty acid composition of dietary fat may have an effect on GIP secretion (38). Linoleic acid induced a significant GIP response in primary K cell culture. These cells express GPR40, -120, and -119, which are receptors known to be involved in fatty acid sensing, thereby raising the possibility that the fatty acid-sensing mechanisms of these cells could be mediated by these receptors (10,25). For instance, Edfalk et al. (16) showed that the GIP response induced by fat was impaired in GPR40 mutant mice.

Carbohydrates. The mechanism behind GIP secretion by carbohydrates is associated with intestinal SGLT1. The fact that phlorizdin, a SGLT1 inhibitor, impairs glucose-stimulated GIP release supports this idea. However, because stimulation with α -methylglucopyranoside, a nonmetabolizable substrate

of SGLT1, gives a significantly lower GIP response compared to glucose, a further glucose metabolism is thought to be needed to fully induce GIP secretion (25).

Jang et al. (39) found that mice knocked-out for α -gustducin (a component of the sweet taste receptor signaling cascade) had deficiencies in GIP secretion as well as decreased insulin response and impaired glucose tolerance. Based on the latter fact, a mechanism related to the presence of sweet taste receptors in the gut has been thought to be involved in carbohydrate-induced GIP secretion. Although the same research group found that sucralose, an artificial sweetener, induced GIP secretion in a murine cell line (40), other authors did not demonstrate the induction of GIP secretion in vitro and in vivo by such artificial sweeteners as acesulfame K, saccharin, or sucralose (41). Therefore, it seems that the evidence for the role of sweet taste receptors in GIP induction is inconclusive and more studies are needed to determine the exact role of sweet taste receptors in the carbohydrate induction of GIP secretion (42).

Protein. The effect of protein on GIP secretion has been poorly studied. Although some studies report no effect of whole protein on GIP secretion (35), the administration of protein hydrolyzate to rats more recently induced a significant response on GIP secretion, and the administration of omeprazole, an inhibitor of gastric acid secretion, severely diminished the response, suggesting that the effect could be partially mediated by the acid-stimulatory properties of protein (43). The administration of a protein beverage in healthy subjects stimulated modest GIP secretion alone or in combination with glucose (44). Later, Carr et al. (45) showed strong GIP secretion after the administration of a protein-rich meal in healthy participants. Another study even observed that GIP stimulation in healthy individuals was different with differing types of proteins, with whey being the most potent inducer (46). A similar effect was observed in patients with type 2 diabetes in whom the addition of whey protein to the breakfast or lunch meal induced a greater response in GIP secretion compared with other sources of protein (47). The latter suggests that the amino acid pattern can modify the postprandial GIP response. For instance, prior studies have reported the induction of GIP secretion by certain amino acids (10,48), whereas Parker et al. (25) showed a potent induction of GIP secretion by glutamine in K primary cells.

Other diet components. Other non-nutrient components of the diet, such as coffee, are known to effect GIP secretion. In a study by Johnston et al. (49), the secretion of GIP was significantly decreased when coffee plus glucose was ingested in contrast to glucose alone, and this effect was even greater with decaffeinated coffee. These researchers suggested that the phenolic compounds present in coffee inhibit glucose transport, thereby attenuating GIP secretion (49). In contrast, Beaudoin et al. (50) showed that the consumption of coffee (regular or decaffeinated) before an oral glucose tolerance test and after an oral fat tolerance test increased the GIP response. The difference in findings could

be due to the distinct methodologies of the studies. Therefore, more studies are needed to characterize the role of coffee in GIP secretion. However, it seems likely that coffee, whether caffeinated or decaffeinated, interacts with enteroendocrine cells to modify the GIP response.

I cells and CCK

Overview. CCK, as mentioned by Liddle et al. (51), was first described by Ivy and Oldberg in 1928 as a stimulant of gall bladder contraction. However, it is now known that CCK also stimulates pancreatic enzyme secretion and inhibits gastric emptying and food intake. Collectively, these actions fulfill the primary role of CCK in the gastrointestinal tract, which is to regulate protein and fat digestion in the upper small intestine (51–53).

Localization. I cells, which are localized primarily in the upper and intermediate gastrointestinal tract (duodenum and upper jejunum) as well as to the enteric nerves of the colonic wall, are responsible for CCK production and secretion. Importantly, CCK is also released from the central nervous system; however, due to the nature of this review, we will focus primarily on the CCK produced by I cells (54).

I cells are open cells oriented toward the intestinal lumen. They are roughly triangular or flask-shaped with the apical surfaces oriented toward the lumen, while the membrane-bound cytoplasmic granules containing CCK are concentrated around the basal surface (51,54,55). This allows the cell to be stimulated by intestinal nutrients and release their content into the blood and/or surrounding tissue. I cells have been found to be more abundant in intestinal crypts than in the villi, and the presence of pseudopod-like basal processes has recently been described in ~50–65% of the I cell population. Although the functionality of these structures is unknown at present, the authors suggest that these structures could receive information from neighboring cells, which are primarily enterocytes (55).

Similar to other enteroendocrine cells, the I cell turnover time is only a few days and the cells appear to differentiate from an enteroendocrine lineage, which also includes S cells (12).

Biological actions of CCK. Selective processing of proCCK, which is a 115-amino acid precursor, leads to multiple bioactive CCK forms of different lengths. The major circulating forms in humans are CCK-58, -33, -22, and -8, all ligands of the CCK1R (52,54).

As previously mentioned, the primary action of CCK is in gallbladder contraction, which is mediated through CCK-A receptors on the surface of gallbladder smooth muscle (54).

Another role of CCK is to stimulate pancreatic enzyme secretion. Prolonged administration of CCK has been shown to stimulate the synthesis of pancreatic enzymes and cellular proliferation (52). CCK also plays an important role in inhibiting gastric emptying; in fact, blocking CCK-A receptor inhibits the effect of fat and protein on gastric emptying, emphasizing that the ability of fats and proteins to inhibit gastric emptying is CCK dependent (54,56,57).

CCK has been shown to inhibit food intake in multiple test situations and species, including humans. The food intake inhibition effect is observed relatively shortly after food ingestion; however, its duration is also brief. This effect is mediated via activation of vagal afferent mechanosensitive and chemosensitive fibers in the stomach and duodenum (52,54).

More recently, a novel role of CCK was discovered in rodents. Cheung et al. (58) showed that CCK-8 was capable of lowering glucose production via triggering the gut-brain-liver neuronal axis. This effect was absent in CCK receptor-deficient rats (OLETF rats) and rats fed a high-fat diet, suggesting that intestinal CCK resistance leads to the dysregulation of glucose production and homeostasis in diet-induced obesity.

Diet effects and mechanisms. Fasting plasma CCK concentrations are ~ 1 pmol/L in most species and rise to 5–10 pmol/L following meal ingestion. Dietary fat and proteins are the most potent stimulators of CCK release, whereas carbohydrates are weak stimulators (48,51,54).

Dietary fat. Dietary fat has been shown to stimulate CCK release in animals and humans. In both species, TG must be hydrolyzed to fatty acids to stimulate CCK secretion. For instance, pancreatic lipase insufficiency is associated with a poor CCK response to TG but a normal response to oleic acid (48,54,59). In addition, intestinal infusion of the lipase inhibitor, orlistat, together with TG virtually abolishes the postprandial release of CCK (60,61). The length of the fatty acid carbon chain also determines CCK release. Most research studies have shown that fatty acids with an acyl chain length < 10 carbon atoms do not induce CCK secretion in humans, whereas long-chain fatty acids with at least 12 carbons are the most potent stimulators of CCK (48,62). The sensing mechanism by which I cells detect long-chain fatty acids and trigger CCK secretion has long been associated with GPR. In the intestine cell line STC-1, Tanaka et al. (63) showed that long-chain fatty acid-induced CCK secretion was mediated via GPR120 (63). However, recently, using fluorescence-activated cell sorting isolation of CCK-producing cells (I cells), Liou et al. (18) demonstrated that the expression of GPR40 was 100-fold greater in cells producing CCK compared to cells that did not express it. They also showed that CCK secretion in vitro in response to linolenic was absent in GPR40 $-/-$ cells, whereas GPR40 null mice had a severely impaired CCK response induced by long-chain fatty acids. Because the response in mice was not completely blunted, Liou et al. (18) discussed that it was likely that an indirect fatty acid-sensing mechanism may be associated with chylomicron component ApoA-IV. In fact, ApoA-IV secreted by enterocytes in response to absorption of long-chain fatty acids previously has been associated with a satiety factor and an activator of CCK-responsive vagal afferents; however, its exact role remains to be elucidated (64–67).

Carbohydrates. Carbohydrates have been shown to mildly induce CCK release; however, the sensing mechanisms have not yet been elucidated. Although taste receptors have been associated with gut hormone-releasing mechanisms from

the enteroendocrine cell, Gerspach et al. (68) recently showed that inhibition of the sweet taste receptor T1R2/T1R3 by lactisole with a glucose load in healthy humans did not modify the CCK response, suggesting that glucose-induced CCK secretion is not mediated by these sweet taste receptors and that other glucose-sensing receptors must be involved.

Proteins. Proteins and, more specifically, digested proteins (protein hydrolyzates) are more effective stimulants of CCK secretion than are carbohydrates (69,70). Amino acids have been shown to have a direct effect on I cells, being the most effective aromatic amino acids. The specific sensing mechanism of these amino acids was recently demonstrated to occur via a GPR, the CaSR. Wang et al. (70) suggested that CaSR modulates signaling pathways that, upon L-phenylalanine and tryptophan stimulation in the presence of calcium, open calcium channels, causing an increase in intracellular Ca^{2+} , and, in parallel, inhibit basal K^+ channel activity, causing I cell depolarization, which is consistent with changes necessary for hormone secretion. This effect is abolished in native I cells with deletion of CaSR without affecting basal CCK secretion, suggesting that CaSR is required for CCK secretion in response to these aromatic amino acids (70). Additionally, Nakajima et al. (71) showed that in the STC-1 enteroendocrine cell line, the CCK secretion and Ca^{2+} mobilization induced by an arginine-rich $\beta 51-63$ peptide from soybean β -conglycin was blocked when incubated with a CaSR antagonist, suggesting that this effect is also mediated by the CaSR.

Luminal protein hydrolysate (peptone) increases not only the secretion of CCK but also its transcription (15). The sensing mechanism of peptone is related to GPR93, because in the overexpression of GPR93 in STC-1 cells (an enteroendocrine cell line), a significant increase in CCK transcription and secretion was observed upon peptone stimulation. In parallel, an increase in cAMP level was observed, suggesting that the peptone-induced secretion of CCK in STC-1 cells could be mediated via cAMP; however, whether this mechanism is functional in the enteroendocrine I cell remains to be elucidated (15,18).

Other dietary components. Dietary fiber has been shown to affect postprandial CCK release. In several studies, mainly viscous soluble fibers produced a greater effect on postprandial CCK secretion compared to low fiber or control meal (72,73).

Other dietary components, such as steroid glycosides from *H. gordonii*, which is a plant grown in Africa that has been shown to decrease food intake, as well as other bitter tastants, have been shown to induce CCK release in enteroendocrine cells lines. The mechanism was recently suggested to be associated with bitter taste-sensing mechanisms coupled to hormone release (74); however, their relevance in vivo remains to be determined.

L cells: GLP-1, PYY, and GLP-2

L cells overview. GLP-1 was first described in 1983 by Bell et al. (75) as a fragment of the proglucagon molecule. In a later study in 1985, Schmidt et al. (76) described the potent

insulinotropic actions of GLP-1 and it was therefore characterized as the second incretin hormone (77).

Although L cells were initially classified due to the secretion of GLP-1, they also secrete GLP-2, PYY, and oxyntomodulin. PYY was initially isolated in the 1980s from porcine intestine. Although PYY is released from L cells as a 36-amino acid peptide, it is readily truncated by dipeptidylpeptidase IV, resulting in 2 circulating isoforms, PYY₁₋₃₆ and PYY₃₋₃₆ (78,79).

Localization. The L cell is an open-type intestinal cell that makes direct contact with the lumen of the gut and senses the passage of nutrients along the gastrointestinal tract (6). In keeping with K cells, L cells are scattered along the gastrointestinal tract; however, the highest density has been found in the distal ileum and colon (80) and, as with other enteroendocrine cells, their secretory granules are harbored at their base.

Recently, the morphology of L cells from the ileum and colon has been studied more thoroughly by Bohorquez et al. (80). They found that L cells in the ileum have a classic L shape form with long extending basal processes, whereas those present in the colon have a spindle- or sigmoidal-like contour that weaves between epithelial cells while also maintaining contact with both the lumen and lamina propria. These researchers suggest that this particular shape may allow nutrient absorption and may result in gut hormones being secreted in an endocrine and paracrine manner.

Biological actions: GLP-1, PYY, and GLP-2. GLP-1 contributes to glucose homeostasis not only by potentiating insulin release but also via its pancreatic and extra-pancreatic actions, which contribute to the pleiotropic effects of this hormone. GLP-1 has been shown to stimulate GIP secretion, induce β -cell proliferation, increase insulin gene transcription and mRNA stability, and suppress glucagon secretion via direct interaction with the GLP-1 receptor in pancreatic α -cells and indirectly via stimulation of somatostatin and insulin secretion. Its extra-pancreatic actions include the inhibition of gastric acid secretion, gastric emptying and motility, and modification of the nutrient entry rate into the circulation; thus, it plays a key role in the regulation of blood glucose levels (77). GLP-1 has also been characterized as a key regulator of appetite and food intake by directly stimulating anorectic pathways in the hypothalamus and brainstem and by acting through the vagus nerve (1,81).

The biological action of PYY involves a wide range of digestive functions, which include regulation of insulin secretion, inhibition of gastric acid secretion, gastric emptying, mouth-to-cecum transit time, and gallbladder contraction in the cephalic phase in humans, with the latter functions being carried out by the PYY₁₋₃₆ isoform. On the other hand, PYY₃₋₃₆ has been shown to potently decrease appetite and reduce weight gain at physiological levels (80,82). These anorectic effects are mediated via interaction with the vagus nerve and the hypothalamus (48). Of the 2 PYY isoforms, PYY₃₋₃₆ appears to be the dominant isoform in humans,

constituting ~65% of the circulating PYY during the fasting state (83).

GLP-2 is a 33-amino acid peptide whose main biological role has been associated with intestinotrophic actions, such as crypt cell proliferation and reduction in enterocyte apoptosis as well as enhancement of hexose transport, reduction of epithelial permeability, improvement of gut barrier function, and reduction of gastric motility and acid secretion (84,85).

Diet effects and mechanisms.

GLP-1. GLP-1 levels in plasma in the fasting state are typically in the 5–10 pmol/L range and they rise within 10–15 min after meal ingestion, reaching peak levels of 15–50 pmol/L around min 40 (6,81,86).

Although all macronutrients (proteins, carbohydrates, and lipids) have been shown to stimulate GLP-1 secretion (87), the magnitude of the response varies between nutrients and the general consensus is that carbohydrates and lipids are more potent stimulators of GLP-1 release than are proteins (88–91).

Carbohydrates. Carbohydrate, and more specifically glucose, is a potent stimulator of GLP-1 in vivo and in vitro, although the underlying mechanisms for its stimulation are still a matter of debate. The proposed mechanism includes the closure of the KATP channel, SGLT1 activity, activation of sweet taste receptors, and the proximal-distal loop pathway. The latter was initially proposed to explain the early phases of GLP-1 secretion, given that L cells are primarily located in the distal part of the small intestine and colon (6). However, it is now clear that direct exposure of enteroendocrine L cells to carbohydrates is also needed, because glucose-induced GLP-1 secretion was severely diminished when the infusion was limited to the proximal 60 cm of the intestine, thereby leaving the ileum and colon (the richest source of L cells) without stimulation (92).

Nielsen et al. (93) observed the presence of KIR6.2, a major subunit of the KATP channel, in human L cells via immunostaining. Later, Reimann et al. (94) demonstrated that L cells have functional KATP channels. However, because sulfonylureas, which stimulate insulin secretion of β -cells by inducing KATP channel closure, are unable to stimulate GLP-1 secretion in humans (95), the implication of these channels in glucose-stimulated GLP-1 secretion has been questioned.

Additionally, the principle glucose transporter on the luminal surface, SGLT1, has been implicated in glucose stimulation of GLP-1 secretion via its ability to trigger membrane depolarization through electrogenic action (96). In fact, Phloridzin, which blocks SGLT1, has been shown to inhibit the release of GLP-1 completely in response to glucose in animal models, demonstrating that contact with the intestinal mucosa is not sufficient to stimulate GLP-1 secretion (97).

As discussed earlier, the presence of the taste receptor machinery in enteroendocrine cell lines, animal models, and humans (39,98,99) as well as the impairment in secreting GLP-1 in response to an oral glucose load in α gustducin

null mice (39,100) has suggested a role for sweet taste receptors in the secretion of GLP-1. Although the ingestion of sweeteners alone did not stimulate GLP-1 secretion in humans, the observation that sweeteners in combination with carbohydrates stimulate glucose absorption (101) has raised the question of whether this combination may have a synergistic effect on incretin release (102). Brown et al. (103) observed a synergistic effect of 75 g of glucose and diet soda (sucralose + acesulfame K) in the secretion of GLP-1. In addition, Gerspach et al. (68) recently showed that glucose-induced GLP-1 secretion was significantly diminished when lactisole, a sweet taste receptor inhibitor, was also administered. The observed effect was different when glucose was administered i.g. or intraduodenally, which suggests a complex regulation mechanism (68). It seems that sweet taste receptors do play a role, at least in glucose-induced GLP-1 secretion; however, sweet taste receptors do not seem to be the only mechanism responsible for GLP-1 release and more studies are needed to reveal the exact role of these receptors in GLP-1 secretion.

Dietary fat. Fat, as previously mentioned, is a potent inducer of GLP-1 release. However, the response to fat seems to be delayed compared to the response to carbohydrates. The length of fatty acids as well as the degree of unsaturation appears to influence the magnitude of the response (104,105). Thomsen et al. (38) observed that GLP-1 secretion in healthy humans was greater in response to olive oil (rich in MUFA) than with butter (rich in SFA). The same effect, although to a lesser degree, was observed years later by the same author in patients with type 2 diabetes (106). In addition, Feltrin et al. (107) showed that when lauric acid (12 carbon atoms fatty acid) was administered intraduodenally, it induced a significant GLP-1 response, whereas decanoic acid (C10 fatty acid) did not. Another interesting finding by Yoder et al. (108) was that the lipid-induced response of GLP-1 secretion in rats appears to be dose dependent when administered intraduodenally.

In vitro and in vivo studies have tried to elucidate the mechanism for fat-induced GLP-1 secretion. The hydrolysis of TG into FFA appears to be necessary for its stimulation, because several authors have reported that in the presence of orlistat, a lipase inhibitor, the GLP-1 response in humans is significantly attenuated (61,105,109). Beglinger (105) also found that administration of a CCK1R antagonist with long-chain fatty acids, such as oleic acid (C18:1), severely diminished the secretion of GLP-1, suggesting that long-chain fatty acids first stimulate CCK secretion, which subsequently acts on CCK1R, initiating the response on GLP-1.

The presence of certain GPR, such as GPR119, -120, -40, and -43, which are known as signaling mediators of fatty acids, has been identified in the intestine and enteroendocrine cells and cell lines (16,104,110,111), suggesting that these receptors play a role in the induction of fat-induced gut hormone secretion. Hirasawa et al. (104) observed that GPR120 functions as a receptor for unsaturated long-chain fatty acids, promoting the secretion of GLP-1 in vivo and in vitro with a parallel, transient increase in intracellular calcium (63). Edfalk

et al. (16) showed coexpression of GPR40 with GLP-1 in GLP-1-producing cells and observed a decreased response to fat-induced GLP-1 in GPR40 null mice. Chu et al. (110) found that activating GPR119, a receptor of the naturally occurring lipid oleoylethanolamide, with an agonist significantly increased GLP-1 and improved glucose tolerance (112).

Proteins. Proteins are weak stimulators of GLP-1 release (89,90); however, it seems that protein hydrolysis is necessary. Different proteins have been shown to induce differential responses to GLP-1; for instance, whey protein exerts a significant major increase in postprandial GLP-1 levels compared to casein (113). This effect has been associated with the amino acid profile of the proteins. Reimann et al. (114) observed the effects of different amino acids in GLP-1 secretion in GLUTag cells, an enteroendocrine cell line, and found that glutamine was the most potent, whereas phenylalanine or arginine had no effect. The effect of glutamine was confirmed in healthy, obese, and diabetic participants (115). Another study even found that the consumption of glutamine before a mixed meal increased postprandial GLP-1 secretion, thereby improving glucose levels in type 2 diabetic individuals (116). More recently, Tolhurst et al. (117) confirmed this effect in isolated mouse L cells. They found that the mechanism was associated with an increase in cAMP and cytosolic Ca^{2+} . Although it is not clear whether the stimulation is from the apical or basolateral surface, they suggest the possible existence of a glutamine-responsive membrane receptor coupled to Gs signaling pathways. Le Neve et al. (118) recently showed in the NCI-H716 cell line, a human enteroendocrine cell line, that GLP-1 secretion was induced by selective tetrapeptides and was accompanied by an increase in intracellular calcium. They ruled out any specific amino acid induction, because neither the shorter peptides nor the corresponding amino acids were able to elicit a response. In contrast to the effects seen in other cell lines, they observed no changes in cAMP. They discussed that although the nature of the sensor and the intracellular mechanisms underlying stimulus-secretion coupling remain unknown, it probably involves store-operated calcium channels, because the addition of 2-Aminoethoxydiphenyl borate, a store-operated calcium channel inhibitor, abolished both the $[Ca^{2+}]_i$ response and the GLP-1 release from NCI-H716 cells (118).

Results found by other authors in STC-1 cells, an enteroendocrine cell line model (119), suggest that Na-coupled neutral amino acid transporter 2 could also be a possible candidate for sensing amino acids, resulting in membrane depolarization, and thereby allowing an increase in intracellular calcium in enteroendocrine cells. Despite the considerable advances made in our understanding of protein and amino acid sensing in enteroendocrine cells, it is clear that more research is needed to fully characterize the mechanisms underlying GLP-1 secretion induced by proteins.

Other diet components. Other dietary components have been shown to influence GLP-1 levels. Basal GLP-1 levels have been observed to be significantly increased in obese

rodents with chronic administration of the prebiotic fiber oligofructose compared to the nonfermentable fiber cellulose (120). In the same line, chronic administration of nondigestible carbohydrates in humans, which are fermented by intestinal microflora, have been shown to increase postprandial GLP-1 levels. Cani et al. (120) showed that the latter effect was positively associated with breath hydrogen excretion, thus suggesting that the increase in GLP-1 levels could be related to production of SCFA produced by bacterial fermentation. Indeed, the SCFA receptor GPR43 has been positively identified in L cells (121). Moreover, Kaji et al. (122) recently showed that feeding rats with a fructooligosaccharide-containing diet increased the densities of the GPR43-positive enteroendocrine cells in the proximal colon by over 2-fold compared to controls. Furthermore, the mechanisms of SCFA induction in GLP-1 levels have been associated with intestinal differentiation of stem cells into L cells as well as the promotion of GLP-1 synthesis in the lower part of the gut (123). Other dietary fibers, such as resistant starch, increased basal and postprandial levels of GLP-1 in rodents (124). The intake of wheat fiber for >9 mo in hyperinsulinemic subjects was sufficient to increase postprandial GLP-1 levels (4).

Other dietary components, such as capsaicin, the pungent principle in hot red peppers or chiles, have been shown to mildly increase the secretion of GLP-1. The authors suggested that these could be associated with increased gastric emptying, resulting in earlier stimulation of L cells (125). However, because this is the first study to observe this effect, it is clear that more studies are needed to elucidate the effect of capsaicin on gut hormone release.

PYY

PYY concentrations rise within 15–30 min after meal ingestion and appear to be initiated by an indirect neuronal reflex, because its release occurred before the meal could trigger PYY secretion from colon cells (126). PYY secretion is stimulated by different macronutrients and is partially related to the calories ingested. Although it has been generally observed that fat is the most potent stimulator of PYY release in humans (48,127–129), other authors have reported that protein-rich diets cause the greatest increase in PYY levels in healthy and obese humans as well as in rodents. The latter is associated with a greater satiety effect (83). In most cases, carbohydrates appear to be the less potent secretagogues of PYY. Lomenick et al. (129) have also shown that the response to different macronutrients varies between normal weight and obese individuals. In obese subjects, fat- and carbohydrate-induced PYY secretion was significantly reduced compared to lean subjects, whereas the response induced by protein increased. Batterham et al. (83), on the other hand, found that PYY secretion decreased in obese subjects upon stimulation with all macronutrients. Although the variations observed in these 2 studies are inconsistent, it is clear that obese subjects have a modified response to PYY secretion induced by macronutrients. The reason for this effect, although unknown, could be associated with modifications to other physiological signals or

alterations in the sensing mechanisms of enteroendocrine cells in the obese state.

Fat. Fat has been shown to be a potent inductor of PYY secretion, and the hydrolysis of TG appears to be essential for this process, because the administration of orlistat almost completely abolished fat-induced PYY secretion. More recently, Hata et al. (130) found that inhibition of intestinal microsomal TG transfer protein, which is the protein responsible for packing TG into chylomicrons, produced an increase in PYY secretion. In parallel, they found an increased concentration of FFA in the intestinal lumen, suggesting that this increase may be associated with the observed increase in PYY. However, the time course for both events was inconsistent; therefore, further investigation is needed (130). In the same study, the researchers also found elevated concentrations of TG in the intestinal tissue, an expected finding given that microsomal TG transfer protein catalyzes TG packing into chylomicrons. However, this result raises the question of whether the lipid content in the enterocyte may play a role in enteroendocrine cell stimulation.

The length of fatty acids also plays an important role, because only long-chain fatty acids (as oleic acid; C18:1) induced a response, whereas medium-chain fatty acids (caprylic acid; C8:0) did not induce any response. In addition, the administration of a CCK-1R antagonist in healthy subjects almost attenuated the long-chain fatty acid-induced PYY secretion, suggesting that the induction of PYY secretion by long-chain fatty acids is partly through CCK stimulation (60). As per the present data, it would be interesting to study fatty acid induction in PYY secretion in isolated L cells to determine whether CCK alone is responsible for the long-chain fatty acid-induced response in PYY.

Carbohydrates. Recently, Gerspach et al. (68) showed that i.g. glucose-induced PYY secretion was significantly decreased in the presence of lactisole, a sweet taste receptor antagonist in healthy men; however, the latter effect was not seen with the administration of a mixed meal. Thus, they suggest that glucose-induced PYY secretion could be partially mediated by this sweet taste receptor; however, the secretion induced by the other components of the mixed meal (protein and fat) may involve other sensors present in enteroendocrine cells in addition to outweighing the effect induced by glucose.

Other dietary components. Dietary fiber has been shown to modulate PYY secretion and this effect has been associated with the rheological properties of fiber. The reduction in viscosity in oat bran beverages significantly increased PYY secretion (131). Although another study also reported an increase in PYY secretion due to the addition of psyllium fiber (132), this effect was not notably clear, because the macronutrient composition between the test meals and the control meal differed with respect to carbohydrate and, more importantly, fat content. Given that fat is a potent inductor of PYY secretion, this effect may not be entirely due to the addition of fiber.

Chronic ingestion of prebiotics, such as fructooligosaccharides and resistant starch, has also been shown to increase levels of PYY in humans and rodents (120,124,133). This property has been associated with the fermentation of nondigestible polysaccharides by the gut microbiota, which produce SCFA that are thought to stimulate enteroendocrine cells (4).

GLP-2

Although the dietary sensing mechanisms of L cells in relation to GLP-1 secretion have been well studied, their specific effects on the secretion of GLP-2 have not been evaluated. Only Cani et al. (5) have shown that upon chronic administration of oligofructose, a prebiotic fiber to obese mice, basal levels of GLP-2 and GLP-1 increased (120). One can speculate that because they are secreted from the same enteroendocrine cell type, their secretion pathways are similar; however, further research is needed.

Conclusions

This review summarizes the current knowledge concerning dietary effects and interactions with enteroendocrine cells. In the last few years, new molecular techniques have resulted in important advances in our knowledge of the food-sensing mechanisms of enteroendocrine cells, allowing a deeper understanding of these processes. It is clear that food composition, macronutrients, and other non-nutrient components as well as the physical properties of food not only affect the secretion of gut peptides but also their transcription and the differentiation of enteroendocrine cells, which ultimately modifies gut hormone responses.

The role of gut hormones in the maintenance of metabolic homeostasis and their observed alterations in metabolic diseases, such as obesity and type 2 diabetes, has resulted in their being considered as possible targets for the prevention and treatment of these diseases (1). Data have shown that obese

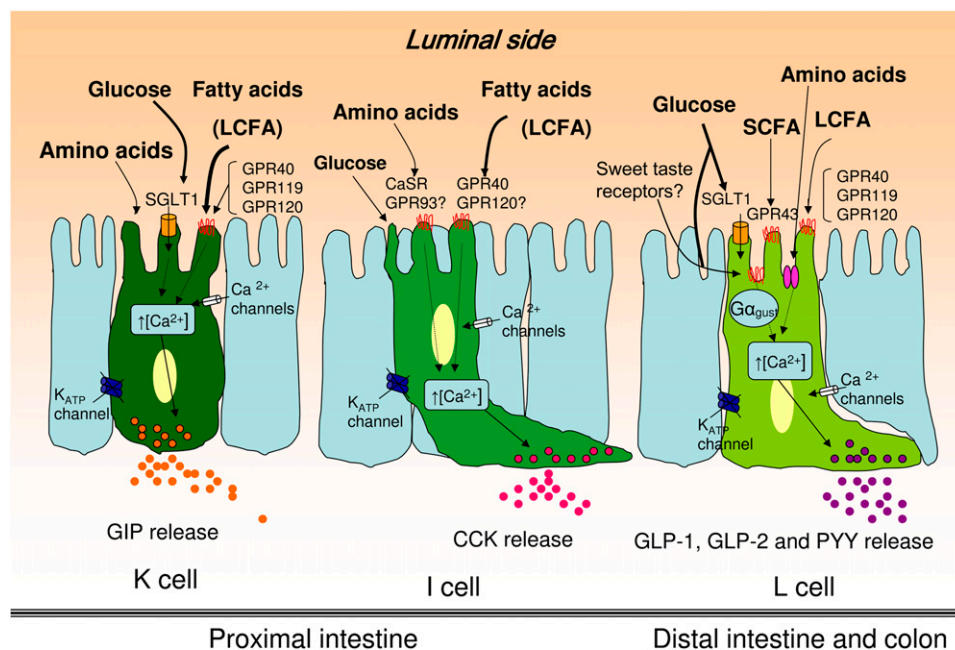
and type 2 diabetic subjects have an increased response to GIP secretion after the ingestion of a meal (10,77). In fact, GIP has been established as a possible link between overnutrition and obesity. In a mouse model of obesity induced by a high-fat diet and in *ob/ob* mice, antagonism of the GIP receptor or GIP knockout was able to prevent or revert some of the metabolic disturbances (32), thereby raising the possibility of targeting GIP secretion or its activity to prevent the metabolic complications associated with obesity (30,31). In addition, GLP-1 analogs are currently a line of treatment for type 2 diabetes due to their effects on incretin and in satiety mechanisms (134,135). Finally, in bariatric surgeries, such as Roux-en-Y gastric by-pass or sleeve gastrectomy, the observed improvement in patients is accompanied by modifications in the gut hormone profile, suggesting a link between the observed weight reduction and the metabolic improvement of gut hormones (78,79).

As discussed throughout this review, gut hormones, such as GIP, CCK, GLP-1, and PYY, play a key role in glucose homeostasis, lipid metabolism, energy expenditure, and food intake. The different macronutrients and non-nutrient components of the diet have a strong influence over the secretion of these hormones. Dietary fat is a potent inducer of GIP and CCK secretion and carbohydrates, specifically glucose, appear to be the major secretagogue of GLP-1, whereas PYY seems to be induced by fat and proteins. Moreover, SCFA produced by gut microbiota because of dietary fiber ingestion have also been shown to modify fasting levels of gut hormones secreted by L cells, highlighting the complex regulation of gastrointestinal peptides (Fig. 2).

An interesting finding is that GPR play a major role in the sensing mechanisms not only for fatty acids but also for carbohydrates and possibly for sweeteners in the form of taste receptors as well as for certain amino acids.

Although further research is still needed to completely elucidate the sensing mechanisms in these cells and to be

FIGURE 2 Food component stimulation of enteroendocrine cells and sensing machinery. K and I cells are primarily localized in the proximal intestine, whereas L cells are predominantly in the distal intestine and colon. A schematic representation of the enteroendocrine cell machinery for the different cell subtypes. See text for details. CaSR, calcium-sensing receptor; GPR, G protein-coupled receptor; LCFA, long-chain fatty acids; SGLT1, sodium-dependent glucose transporter 1.



able to modulate gut hormones specifically through diet, recent advances have revealed that dietary manipulations are a promising strategy for preventing and treating metabolic diseases, such as obesity and type 2 diabetes, which currently present a considerable public health burden. In addition, novel findings may help to elucidate whether the gut hormone modifications observed in metabolic diseases are a cause or a consequence of these disorders.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Adolfo Garcia-Sainz and Dr. Andrea Diaz-Villaseñor for graciously revising the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Literature Cited

- Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature*. 2006;444:854–9.
- Murphy KG, Dhillon WS, Bloom SR. Gut peptides in the regulation of food intake and energy homeostasis. *Endocr Rev*. 2006;27:719–27.
- García-Martínez JM, Chocarro-Calvo A, Moya CM, Garcia-Jimenez C. WNT/beta-catenin increases the production of incretins by enteroendocrine cells. *Diabetologia*. 2009;52:1913–24.
- Freeland KR, Wilson C, Wolever TM. Adaptation of colonic fermentation and glucagon-like peptide-1 secretion with increased wheat fibre intake for 1 year in hyperinsulinaemic human subjects. *Br J Nutr*. 2010;103:82–90.
- Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L, Naslain D, Neyrinck A, Lambert DM, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009;58:1091–103.
- Tolhurst G, Reimann F, Gribble FM. Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *J Physiol*. 2009;587:27–32.
- Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB. Minireview: development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology*. 2004;145:2639–44.
- Gerbe F, van Es JH, Makrini L, Brulin B, Mellitzer G, Robine S, Romagnolo B, Shroyer NE, Bourgaux JF, Pignodel C, et al. Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J Cell Biol*. 2011;192:767–80.
- Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet*. 2006;7:349–59.
- Cho YM, Kieffer TJ. K-cells and glucose-dependent insulinotropic polypeptide in health and disease. *Vitam Horm*. 2010;84:111–50.
- Moran GW, Leslie FC, Levison SE, McLaughlin JT. Enteroendocrine cells: neglected players in gastrointestinal disorders? *Therap Adv Gastroenterol*. 2008;1:51–60.
- Jenny M, Uhl C, Roche C, Duluc I, Guillermin V, Guillemot F, Jensen J, Kedinger M, Gradwohl G. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J*. 2002;21:6338–47.
- Höcker M, Wiedenmann B. Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;859:160–74.
- Mellitzer G, Beucher A, Lobstein V, Michel P, Robine S, Kedinger M, Gradwohl G. Loss of enteroendocrine cells in mice alters lipid absorption and glucose homeostasis and impairs postnatal survival. *J Clin Invest*. 2010;120:1708–21.
- Choi S, Lee M, Shiu AL, Yo SJ, Hallden G, Aponte GW. GPR93 activation by protein hydrolysate induces CCK transcription and secretion in STC-1 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:G1366–75.
- Edfalk S, Steneberg P, Edlund H. Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes*. 2008;57:2280–7.
- Engelstoft MS, Egerod KL, Holst B, Schwartz TW. A gut feeling for obesity: 7TM sensors on enteroendocrine cells. *Cell Metab*. 2008;8:447–9.
- Liou AP, Chavez DI, Espero E, Hao S, Wank SA, Raybould HE. Protein hydrolysate-induced cholecystokinin secretion from enteroendocrine cells is indirectly mediated by the intestinal oligopeptide transporter PepT1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300:G895–902.
- Brown JC. A gastric inhibitory polypeptide. I. The amino acid composition and the tryptic peptides. *Can J Biochem*. 1971;49:255–61.
- Dupre J, Ross SA, Watson D, Brown JC. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1973;37:826–8.
- Buffa R, Polak JM, Pearce AG, Solcia E, Grimelius L, Capella C. Identification of the intestinal cell storing gastric inhibitory peptide. *Histochemistry*. 1975;43:249–55.
- Theodorakis MJ, Carlson O, Michopoulos S, Doyle ME, Juhaszova M, Petraki K, Egan JM. Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290:E550–9.
- Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regul Pept*. 2003;114:189–96.
- Fujita Y, Chui JW, King DS, Zhang T, Seufert J, Pownall S, Cheung AT, Kieffer TJ. Pax6 and Pdx1 are required for production of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in proglucagon-expressing L cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295:E648–57.
- Parker HE, Habib AM, Rogers GJ, Gribble FM, Reimann F. Nutrient-dependent secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide from primary murine K cells. *Diabetologia*. 2009;52:289–98.
- Tsukiyama K, Yamada Y, Yamada C, Harada N, Kawasaki Y, Ogura M, Bessho K, Li M, Amizuka N, Sato M, et al. Gastric inhibitory polypeptide as an endogenous factor promoting new bone formation after food ingestion. *Mol Endocrinol*. 2006;20:1644–51.
- Ding KH, Shi XM, Zhong Q, Kang B, Xie D, Bollag WB, Bollag RJ, Hill W, Washington W, Mi QS, et al. Impact of glucose-dependent insulinotropic peptide on age-induced bone loss. *J Bone Miner Res*. 2008;23:536–43.
- Getty-Kaushik L, Song DH, Boylan MO, Corkey BE, Wolfe MM. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide modulates adipocyte lipolysis and reesterification. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:1124–31.
- Kim SJ, Nian C, McIntosh CH. Resistin is a key mediator of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of lipoprotein lipase (LPL) activity in adipocytes. *J Biol Chem*. 2007;282:34139–47.
- Irwin N, Flatt PR. Evidence for beneficial effects of compromised gastric inhibitory polypeptide action in obesity-related diabetes and possible therapeutic implications. *Diabetologia*. 2009;52:1724–31.
- Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, Fujimoto S, Oku A, Tsuda K, Toyokuni S, et al. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med*. 2002;8:738–42.
- McClellan PL, Irwin N, Cassidy RS, Holst JJ, Gault VA, Flatt PR. GIP receptor antagonism reverses obesity, insulin resistance, and associated metabolic disturbances induced in mice by prolonged consumption of high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293:E1746–55.
- Song DH, Getty-Kaushik L, Tseng E, Simon J, Corkey BE, Wolfe MM. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide enhances adipocyte development and glucose uptake in part through Akt activation. *Gastroenterology*. 2007;133:1796–805.
- Fulurija A, Lutz TA, Sladko K, Osto M, Wielinga PY, Bachmann MF, Saudan P. Vaccination against GIP for the treatment of obesity. *PLoS ONE*. 2008;3:e3163.
- Elliott RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V. Glucagon-like peptide-1 (7–36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol*. 1993;138:159–66.
- Drucker DJ. The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2007;117:24–32.

37. Enç FY, Ones T, Akin HL, Dede F, Turoglu HT, Ulfer G, Bekiroglu N, Haklar G, Rehfeld JF, Holst JJ, et al. Orlistat accelerates gastric emptying and attenuates GIP release in healthy subjects. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296:G482–9.
38. Thomsen C, Rasmussen O, Lousen T, Holst JJ, Fenselau S, Schrezenmeir J, Hermansen K. Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:1135–43.
39. Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, Zhou J, Kim HH, Xu X, Chan SL, Juhaszova M, et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:15069–74.
40. Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KS, Ilegems E, Daly K, Maillet EL, Ninomiya Y, Mosinger B, Shirazi-Beechey SP. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:15075–80.
41. Fujita Y, Wideman RD, Speck M, Asadi A, King DS, Webber TD, Haneda M, Kieffer TJ. Incretin release from gut is acutely enhanced by sugar but not by sweeteners in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296:E473–9.
42. Renwick AG, Molinary SV. Sweet-taste receptors, low-energy sweeteners, glucose absorption and insulin release. *Br J Nutr.* 2010;104:1415–20.
43. Wolfe MM, Zhao KB, Glazier KD, Jarboe LA, Tseng CC. Regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide release by protein in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279:G561–6.
44. Karamanlis A, Chaikomin R, Doran S, Bellon M, Bartholomeusz FD, Wishart JM, Jones KL, Horowitz M, Rayner CK. Effects of protein on glycemic and incretin responses and gastric emptying after oral glucose in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:1364–8.
45. Carr RD, Larsen MO, Winzell MS, Jelic K, Lindgren O, Deacon CF, Ahren B. Incretin and islet hormonal responses to fat and protein ingestion in healthy men. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295: E779–84.
46. Nilsson M, Stenberg M, Frid AH, Holst JJ, Bjorck IM. Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1246–53.
47. Frid AH, Nilsson M, Holst JJ, Bjorck IM. Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr.* 2005;82:69–75.
48. Karhunen LJ, Juvonen KR, Huotari A, Purhonen AK, Herzig KH. Effect of protein, fat, carbohydrate and fibre on gastrointestinal peptide release in humans. *Regul Pept.* 2008;149:70–8.
49. Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:728–33.
50. Beaudoin MS, Robinson LE, Graham TE. An oral lipid challenge and acute intake of caffeinated coffee additively decrease glucose tolerance in healthy men. *J Nutr.* 2011;141:574–81.
51. Liddle RA. Cholecystokinin cells. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:221–42.
52. Johnson LR, editor. *Physiology of the gastrointestinal tract.* 4th ed. Burlington, MA: Elsevier Academic Press; 2006.
53. Dockray GJ. Cholecystokinin and gut-brain signalling. *Regul Pept.* 2009;155:6–10.
54. Moran TH, Kinzig KP. Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286:G183–8.
55. Chandra R, Samsa LA, Vigna SR, Liddle RA. Pseudopod-like basal cell processes in intestinal cholecystokinin cells. *Cell Tissue Res.* 2010;341: 289–97.
56. Green T, Dimaline R, Peikin S, Dockray GJ. Action of the cholecystokinin antagonist L364,718 on gastric emptying in the rat. *Am J Physiol.* 1988;255:G685–9.
57. Hölzer HH, Turkelson CM, Solomon TE, Raybould HE. Intestinal lipid inhibits gastric emptying via CCK and a vagal capsaicin-sensitive afferent pathway in rats. *Am J Physiol.* 1994;267:G625–9.
58. Cheung GW, Kokorovic A, Lam CK, Chari M, Lam TK. Intestinal cholecystokinin controls glucose production through a neuronal network. *Cell Metab.* 2009;10:99–109.
59. McLaughlin J, Grazia Luca M, Jones MN, D’Amato M, Dockray GJ, Thompson DG. Fatty acid chain length determines cholecystokinin secretion and effect on human gastric motility. *Gastroenterology.* 1999;116:46–53.
60. Degen L, Matzinger D, Drewe J, Nissle S, Maecke H, Lengsfeld H, Hadvary P, Beglinger C. Role of free fatty acids in regulating gastric emptying and gallbladder contraction. *Digestion.* 2006;74:131–9.
61. Ellrichmann M, Kapelle M, Ritter PR, Holst JJ, Herzig KH, Schmidt WE, Schmitz F, Meier JJ. Orlistat inhibition of intestinal lipase acutely increases appetite and attenuates postprandial glucagon-like peptide-1-(7–36)-amide-1, cholecystokinin, and peptide YY concentrations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:3995–8.
62. McLaughlin J. Long-chain fatty acid sensing in the gastrointestinal tract. *Biochem Soc Trans.* 2007;35:1199–202.
63. Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G. Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008;377:523–7.
64. Fujimoto K, Cardelli JA, Tso P. Increased apolipoprotein A-IV in rat mesenteric lymph after lipid meal acts as a physiological signal for satiation. *Am J Physiol.* 1992;262:G1002–6.
65. Kalogeris TJ, Monroe F, Demichele SJ, Tso P. Intestinal synthesis and lymphatic secretion of apolipoprotein A-IV vary with chain length of intestinally infused fatty acids in rats. *J Nutr.* 1996;126:2720–9.
66. Glatzle J, Darcel N, Rechs AJ, Kalogeris TJ, Tso P, Raybould HE. Apolipoprotein A-IV stimulates duodenal vagal afferent activity to inhibit gastric motility via a CCK1 pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287:R354–9.
67. Lo CM, Zhang DM, Pearson K, Ma L, Sun W, Sakai RR, Davidson WS, Liu M, Raybould HE, Woods SC, et al. Interaction of apolipoprotein AIV with cholecystokinin on the control of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293:R1490–4.
68. Gerspach AC, Steinert RE, Schonenberger L, Graber-Maier A, Beglinger C. The role of the gut sweet taste receptor in regulating GLP-1, PYY and CCK release in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Epub 2011 May 1.
69. Bowen J, Noakes M, Trenerry C, Clifton PM. Energy intake, ghrelin, and cholecystokinin after different carbohydrate and protein preloads in overweight men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:1477–83.
70. Wang Y, Chandra R, Samsa LA, Gooch B, Fee BE, Cook JM, Vigna SR, Grant AO, Liddle RA. Amino acids stimulate cholecystokinin release through the Ca²⁺-sensing receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300:G528–37.
71. Nakajima S, Hira T, Eto Y, Asano K, Hara H. Soybean beta 51–63 peptide stimulates cholecystokinin secretion via a calcium-sensing receptor in enteroendocrine STC-1 cells. *Regul Pept.* 2010;159:148–55.
72. Bourdon I, Yokoyama W, Davis P, Hudson C, Backus R, Richter D, Knuckles B, Schneeman BO. Postprandial lipid, glucose, insulin, and cholecystokinin responses in men fed barley pasta enriched with beta-glucan. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:55–63.
73. Bourdon I, Olson B, Backus R, Richter BD, Davis PA, Schneeman BO. Beans, as a source of dietary fiber, increase cholecystokinin and apolipoprotein b48 response to test meals in men. *J Nutr.* 2001;131:1485–90.
74. Le Nevé B, Foltz M, Daniel H, Gouka R. The steroid glycoside H.g.-12 from *Hoodia gordonii* activates the human bitter receptor TAS2R14 and induces CCK release from HuTu-80 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299:G1368–75.
75. Bell GI, Sanchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC. Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature.* 1983;304:368–71.
76. Schmidt WE, Siegel EG, Creutzfeldt W. Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia.* 1985;28:704–7.
77. Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev.* 2008;60:470–512.
78. Wren AM, Bloom SR. Gut hormones and appetite control. *Gastroenterology.* 2007;132:2116–30.
79. Field BC, Chaudhri OB, Bloom SR. Bowels control brain: gut hormones and obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2010;6:444–53.

80. Bohórquez DV, Chandra R, Samsa LA, Vigna SR, Liddle RA. Characterization of basal pseudopod-like processes in ileal and colonic PYY cells. *J Mol Histol.* 2011;42:3–13.
81. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* 2006;3:153–65.
82. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3–36. *N Engl J Med.* 2003;349:941–8.
83. Batterham RL, Heffron H, Kapoor S, Chivers JE, Chandarana K, Herzog H, Le Roux CW, Thomas EL, Bell JD, Withers DJ. Critical role for peptide YY in protein-mediated satiety and body-weight regulation. *Cell Metab.* 2006;4:223–33.
84. Benjamin MA, McKay DM, Yang PC, Cameron H, Perdue MH. Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse. *Gut.* 2000;47:112–9.
85. Burrin DG, Petersen Y, Stoll B, Sangild P. Glucagon-like peptide 2: a nutrient-responsive gut growth factor. *J Nutr.* 2001;131:709–12.
86. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 2007;87:1409–39.
87. Reimann F. Molecular mechanisms underlying nutrient detection by incretin-secreting cells. *Int Dairy J.* 2010;20:236–42.
88. Lu WJ, Yang Q, Sun W, Woods SC, D'Alessio D, Tso P. The regulation of the lymphatic secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by intestinal absorption of fat and carbohydrate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293:G963–71.
89. Wu T, Rayner CK, Jones K, Horowitz M. Dietary effects on incretin hormone secretion. *Vitam Horm.* 2010;84:81–110.
90. Parker HE, Reimann F, Gribble FM. Molecular mechanisms underlying nutrient-stimulated incretin secretion. *Expert Rev Mol Med.* 2010;12:e1.
91. Nauck MA, Vardarli I, Deacon CF, Holst JJ, Meier JJ. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down? *Diabetologia.* 2011;54:10–8.
92. Little TJ, Doran S, Meyer JH, Smout AJ, O'Donovan DG, Wu KL, Jones KL, Wishart J, Rayner CK, Horowitz M, et al. The release of GLP-1 and ghrelin, but not GIP and CCK, by glucose is dependent upon the length of small intestine exposed. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291:E647–55.
93. Nielsen LB, Ploug KB, Swift P, Orskov C, Jansen-Olesen I, Chiarelli F, Holst JJ, Hougaard P, Porsksen S, Holl R, et al. Co-localisation of the Kir6.2/SUR1 channel complex with glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide expression in human ileal cells and implications for glycaemic control in new onset type 1 diabetes. *Eur J Endocrinol.* 2007;156:663–71.
94. Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM. Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab.* 2008;8:532–9.
95. El-Ouaghli A, Rehring E, Holst JJ, Schweizer A, Foley J, Holmes D, Nauck MA. The dipeptidyl peptidase 4 inhibitor vildagliptin does not accentuate glibenclamide-induced hypoglycemia but reduces glucose-induced glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:4165–71.
96. Gribble FM, Williams L, Simpson AK, Reimann F. A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes.* 2003;52:1147–54.
97. Moriya R, Shirakura T, Ito J, Mashiko S, Seo T. Activation of sodium-glucose cotransporter 1 ameliorates hyperglycemia by mediating incretin secretion in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297:E1358–65.
98. Rozengurt E, Sternini C. Taste receptor signaling in the mammalian gut. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7:557–62.
99. Young RL, Sutherland K, Pezos N, Brierley SM, Horowitz M, Rayner CK, Blackshaw LA. Expression of taste molecules in the upper gastrointestinal tract in humans with and without type 2 diabetes. *Gut.* 2009;58:337–46.
100. Kokrashvili Z, Mosinger B, Margolskee RF. Taste signaling elements expressed in gut enteroendocrine cells regulate nutrient-responsive secretion of gut hormones. *Am J Clin Nutr.* 2009;90:S822–5.
101. Mace OJ, Affleck J, Patel N, Kellett GL. Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J Physiol.* 2007;582:379–92.
102. Ma J, Bellon M, Wishart JM, Young R, Blackshaw LA, Jones KL, Horowitz M, Rayner CK. Effect of the artificial sweetener, sucralose, on gastric emptying and incretin hormone release in healthy subjects. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296:G735–9.
103. Brown RJ, Walter M, Rother KI. Ingestion of diet soda before a glucose load augments glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes Care.* 2009;32:2184–6.
104. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med.* 2005;11:90–4.
105. Beglinger S, Drewe J, Schirra J, Goke B, D'Amato M, Beglinger C. Role of fat hydrolysis in regulating glucagon-like peptide-1 secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:879–86.
106. Thomsen C, Storm H, Holst JJ, Hermansen K. Differential effects of saturated and monounsaturated fats on postprandial lipemia and glucagon-like peptide 1 responses in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:605–11.
107. Feltrin KL, Little TJ, Meyer JH, Horowitz M, Smout AJ, Wishart J, Pilchiewicz AN, Rades T, Chapman IM, Feinle-Bisset C. Effects of intraduodenal fatty acids on appetite, antropyloroduodenal motility, and plasma CCK and GLP-1 in humans vary with their chain length. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287:R524–33.
108. Yoder SM, Yang Q, Kindel TL, Tso P. Stimulation of incretin secretion by dietary lipid: is it dose dependent? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;297:G299–305.
109. O'Donovan D, Horowitz M, Russo A, Feinle-Bisset C, Murolo N, Gentilcore D, Wishart JM, Morris HA, Jones KL. Effects of lipase inhibition on gastric emptying of, and on the glycaemic, insulin and cardiovascular responses to, a high-fat/carbohydrate meal in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2004;47:2208–14.
110. Chu ZL, Carroll C, Alfonso J, Gutierrez V, He H, Lucman A, Pedraza M, Mondala H, Gao H, Bagnol D, et al. A role for intestinal endocrine cell-expressed g protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like Peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic Peptide release. *Endocrinology.* 2008;149:2038–47.
111. Tanaka T, Yano T, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G. Cloning and characterization of the rat free fatty acid receptor GPR120: in vivo effect of the natural ligand on GLP-1 secretion and proliferation of pancreatic beta cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008;377:515–22.
112. Lauffer LM, Iakoubov R, Brubaker PL. GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes.* 2009;58:1058–66.
113. Hall WL, Millward DJ, Long SJ, Morgan LM. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *Br J Nutr.* 2003;89:239–48.
114. Reimann F, Williams L, da Silva Xavier G, Rutter GA, Gribble FM. Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *Diabetologia.* 2004;47:1592–601.
115. Greenfield JR, Farooqi IS, Keogh JM, Henning E, Habib AM, Blackwood A, Reimann F, Holst JJ, Gribble FM. Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, and type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:106–13.
116. Samocha-Bonet D, Wong O, Synnott EL, Piyaratna N, Douglas A, Gribble FM, Holst JJ, Chisholm DJ, Greenfield JR. Glutamine reduces postprandial glycemia and augments the glucagon-like peptide-1 response in type 2 diabetes patients. *J Nutr.* 2011;141:1233–8.
117. Tolhurst G, Zheng Y, Parker HE, Habib AM, Reimann F, Gribble FM. Glutamine triggers and potentiates glucagon-like peptide-1 secretion by raising cytosolic Ca²⁺ and cAMP. *Endocrinology.* 2011;152:405–13.
118. Le Nevé B, Daniel H. Selected tetrapeptides lead to a GLP-1 release from the human enteroendocrine cell line NCI-H716. *Regul Pept.* 2011;167:14–20.
119. Young SH, Rey O, Sternini C, Rozengurt E. Amino acid sensing by enteroendocrine STC-1 cells: role of the Na⁺-coupled neutral amino acid transporter 2. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;298:C1401–13.

120. Cani PD, Lecourt E, Dewulf EM, Sohet FM, Pachikian BD, Naslain D, De Backer F, Neyrinck AM, Delzenne NM. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *Am J Clin Nutr.* 2009;90:1236–43.
121. Karaki S, Mitsui R, Hayashi H, Kato I, Sugiya H, Iwanaga T, Furness JB, Kuwahara A. Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Res.* 2006;324:353–60.
122. Kaji I, Karaki S, Tanaka R, Kuwahara A. Density distribution of free fatty acid receptor 2 (FFA2)-expressing and GLP-1-producing enteroendocrine L cells in human and rat lower intestine, and increased cell numbers after ingestion of fructo-oligosaccharide. *J Mol Histol.* 2011;42:27–38.
123. Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM. Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *J Nutr.* 2007;137:S2547–51.
124. Zhou J, Martin RJ, Tulley RT, Raggio AM, McCutcheon KL, Shen L, Danna SC, Tripathy S, Hegsted M, Keenan MJ. Dietary resistant starch upregulates total GLP-1 and PYY in a sustained day-long manner through fermentation in rodents. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295:E1160–6.
125. Smeets AJ, Westerterp-Plantenga MS. The acute effects of a lunch containing capsaicin on energy and substrate utilisation, hormones, and satiety. *Eur J Nutr.* 2009;48:229–34.
126. Kirchner H, Tong J, Tschop MH, Pfluger PT. Ghrelin and PYY in the regulation of energy balance and metabolism: lessons from mouse mutants. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298:E909–19.
127. Essah PA, Levy JR, Sistrun SN, Kelly SM, Nestler JE. Effect of macronutrient composition on postprandial peptide YY levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:4052–5.
128. Helou N, Obeid O, Azar ST, Hwalla N. Variation of postprandial PYY 3–36 response following ingestion of differing macronutrient meals in obese females. *Ann Nutr Metab.* 2008;52:188–95.
129. Lomenick JP, Melguizo MS, Mitchell SL, Summar ML, Anderson JW. Effects of meals high in carbohydrate, protein, and fat on ghrelin and peptide YY secretion in prepubertal children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:4463–71.
130. Hata T, Mera Y, Ishii Y, Tadaki H, Tomimoto D, Kuroki Y, Kawai T, Ohta T, Kakutani M. JTT-130, a novel intestine-specific inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein, suppresses food intake and gastric emptying with the elevation of plasma peptide YY and glucagon-like peptide-1 in a dietary fat-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;336:850–6.
131. Juvonen KR, Purhonen AK, Salmenkallio-Marttila M, Lahteenmaki L, Laaksonen DE, Herzig KH, Uusitupa MI, Poutanen KS, Karhunen LJ. Viscosity of oat bran-enriched beverages influences gastrointestinal hormonal responses in healthy humans. *J Nutr.* 2009;139:461–6.
132. Karhunen LJ, Juvonen KR, Flander SM, Liukkonen KH, Lahteenmaki L, Siloaho M, Laaksonen DE, Herzig KH, Uusitupa MI, Poutanen KS. A psyllium fiber-enriched meal strongly attenuates postprandial gastrointestinal peptide release in healthy young adults. *J Nutr.* 2010;140:737–44.
133. Cani PD, Dewever C, Delzenne NM. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *Br J Nutr.* 2004;92:521–6.
134. Giorgino F, Natalicchio A, Leonardini A, Laviola L. Exploiting the pleiotropic actions of GLP-1 for the management of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;78:S59–67.
135. Boyle PJ, Freeman JS. Application of incretin mimetics and dipeptidyl peptidase IV inhibitors in managing type 2 diabetes mellitus. *J Am Osteopath Assoc.* 2007;107 Suppl:S10–6.

1304623



Plantas de México

Cactaceae
Opuntia ficus-indica (L.) Miller

Localidad: Milpa Alta, D.F.; Zona de cultivo sobre Av. Tlaxcala Norte, al este del volcán Teuhtli
Altitud: 2577 m; 19° 13' 21.6" N, 99° 01' 32.6" O
Descripción: Planta con cladodios y espinas, con flor de color amarillo y pequeño fruto verde.

Colector: Sofía Moran 1 28 de Marzo de 2011
Con: Esteban Olvera
Determinó: Carlos Gómez-H. 2011