

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología

**PAPEL DE LA DIETA EN LA SECRECIÓN Y
ACCIÓN DEL GLP-1 SOBRE LA HOMEOSTASIS
DE LA GLUCOSA**

Trabajo presentado por **Pablo Gómez Prieto**,
Licenciado en Biología, para optar al grado
de Doctor.

Director: **Isabel Valverde Alonso**

Ponente: **Inmaculada Canal Beltrán**



FUNDACION JIMENEZ DIAZ

Dra. Isabel Valverde Alonso
Dpt. Metabolismo, Nutrición y Hormonas
Avda. de Reyes Católicos, 2
28040 Madrid
Tel.: 34-915504899
FAX: 34-915440247
e-mail: ivalverde@fjd.es

ISABEL VALVERDE ALONSO, **Doctor en Medicina y Cirugía, y Consultor Jefe del Servicio de Metabolismo, Nutrición y Hormonas de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid,**

CERTIFICA

Que **PABLO GÓMEZ PRIETO**, Licenciado en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, y Becario de la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado *Papel de la dieta en la secreción y acción del GLP-1 sobre la homeostasis de la glucosa*, que presenta como Tesis Doctoral.

Madrid, a 13 de noviembre de 2006

AGRADECIMIENTOS

En este trabajo han colaborado:

- Dra. M^a Luisa Villanueva-Peñacarrillo, docta en el arte y ciencia de la vida, quien creyó en mí desde el principio y, derrochando pericia y tesón, me ha aguantado y ha hecho de mí un científico.
- La Fundación Conchita Rábago, con el siempre imprescindible apoyo económico; la Fundación Jiménez Díaz-Capio, con su inestimable apoyo logístico y formativo.
- Dr. Jesús Cancelas, mi “subdirector” de tesis; en ocasiones me despierto por las noches y pienso que todo lo que sé lo aprendí de él.
- Prof. Willy Malaisse, excelso diabetólogo, que con su amplia experiencia y sabia elocuencia hizo posible la publicación de mis trabajos.
- Elena Escudero, que me dio la oportunidad de conocer el mundo de la Investigación; Inmaculada Canal, “santa Macu”, a quien tantísimo debo y nunca sabré agradecer; ambas incrementais significativamente la calidad media de la humanidad.

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los que me han ayudado en estos cuatro años difíciles:

A los becarios de MNH: Alicia, Bernardo, Luis, Marta, Nieves, Paola, Pilar, Verónica, Vicky. Sin vosotros habría sido insoportable.

A los “vecinos”: Arantxa y Jimena, las cordiales endocrinas; Lourdes y Laura, las fumadoras pasivas; Jose, el karateka epileptólogo; Juan del “más allá”, gran jefe paellero; Guadalupe, que se dejó la piel investigando; y muchos más.

A Vanesa, por ayudarme hasta casi jugarse el puesto, y por su sincera alegría.

A las animaleras: Pilar, Juani, Luisa, las asesinas más entrañables del mundo.

A Beni y Estrella. Los becarios MNH somos el río, vosotras las rocas; espero no haberos erosionado demasiado.

A mis padres —y vecinos—, por tantas cosas. . . Sobre todo por su paciencia; por soportarme, a mi hermano el espantatiburones; y a los que, después de todo, seguís siendo mis amigos. A todos

os quiero.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| PROPÓSITO | 13 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 14 |
| 1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN | 14 |
| 2. MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 | 14 |
| 2.1. Coeficiente de utilización de glucosa | 14 |
| 3. MODELO EXPERIMENTAL DE RESISTENCIA A INSULINA | 15 |
| 3.1. Medición de la resistencia a insulina (clamp) | 15 |
| 4. PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA | 17 |
| 5. DIETAS DE ESTUDIO | 17 |
| 6. ADMINISTRACIÓN INTRAGÁSTRICA | 18 |
| 7. PRUEBA DE RESPUESTA INMEDIATA A LA DIETA | 20 |
| 8. TRATAMIENTO CRÓNICO: RATA NORMAL Y DIABÉTICA | 20 |
| 9. TRATAMIENTO CRÓNICO: RATA RESISTENTE A INSULINA | 21 |
| 10. MUESTRAS DE ESTUDIO | 21 |
| 10.1. Plasma | 22 |
| 10.2. Páncreas e intestino..... | 22 |
| 11. EXTRACCIÓN DE HORMONAS | 22 |
| 11.1. Extracción de insulina del páncreas..... | 22 |
| 11.2. Extracción de GLP-1 del intestino..... | 23 |
| 11.3. Extracción de GLP-1 del plasma | 23 |
| 12. DETERMINACIONES HORMONALES | 24 |
| 12.1. Insulina | 24 |
| a) Producción de ¹²⁵ I-insulina | 24 |
| b) Análisis cuantitativo | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 12.2. Glucagón | 26 |
| a) Producción de ¹²⁵ I-glucagón | 26 |
| b) Análisis cuantitativo | 28 |
| 12.3. GLP-1 | 29 |
| a) Producción de ¹²⁵ I-GLP-1 | 29 |
| b) Análisis cuantitativo | 30 |
| 13. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS | 31 |
| RESULTADOS | 32 |
| 1. RATA NORMAL | 32 |
| 1.1. Respuesta inmediata a fructosa intragástrica | 32 |
| 1.2. Respuesta al tratamiento crónico con fructosa | 36 |
| 1.3. Respuesta inmediata a aceite de oliva intragástrico | 39 |
| 1.4. Respuesta inmediata a la ingestión de pienso estándar + aceite de oliva | 41 |
| 1.5. Respuesta a la ingestión crónica de aceite de oliva | 43 |
| 1.6. Respuesta inmediata a guar intragástrico | 47 |
| 1.7. Respuesta inmediata a la ingestión de pienso estándar + guar | 48 |
| 1.8. Respuesta a la ingestión crónica de guar | 49 |
| 1.9. Respuesta inmediata a la ingestión de pienso estándar + caseína | 52 |
| 1.10. Respuesta a la ingestión crónica de caseína | 53 |
| 2. RATA DIABÉTICA TIPO 2 | 56 |
| 2.1. Respuesta inmediata a la ingestión de pienso estándar + aceite de oliva | 56 |
| 2.2. Respuesta a la ingestión crónica de aceite de oliva | 57 |
| 3. RATA RESISTENTE A INSULINA | 62 |
| 3.1. Validación del modelo de resistencia a insulina inducido con fructosa ... | 62 |
| 3.2. Efecto del aceite de oliva sobre la resistencia a insulina y la secreción hormonal | 64 |
| 3.3. Efecto del guar sobre la resistencia a insulina y la secreción hormonal .. | 65 |
| 4. EFECTO DE LA DIETA SOBRE EL CONTENIDO PANCREÁTICO DE INSULINA . | |
| | 68 |
| 5. EFECTO DE LA DIETA SOBRE EL CONTENIDO INTESTINAL DE GLP-1 | 71 |
| DISCUSIÓN | 75 |

| | |
|--------------------------|------------|
| CONCLUSIONES..... | 85 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 87 |
| ABREVIATURAS..... | 103 |

INTRODUCCIÓN

Diabetes, obesidad, hipertensión, dislipidemia, arteriosclerosis y resistencia a insulina son patologías comúnmente asociadas; la manifestación simultánea de varias de ellas se conoce como síndrome metabólico [Reaven 1988], enfermedad que se está extendiendo rápidamente por todo el planeta a ritmo de epidemia. También se conoce como “diabesidad”, término que hace referencia a la incidencia cada vez mayor de la diabetes asociada a obesidad [Astrup 2000]. La diabetes mellitus es la enfermedad metabólica más frecuente en el mundo industrializado, donde es la primera causa de ceguera, insuficiencia renal y enfermedad vascular periférica en el adulto. Es la consecuencia de un defecto en la producción o acción de la insulina, una hormona peptídica segregada por la célula β del páncreas, cuyo ritmo normal de liberación depende de la concentración de glucosa en sangre; su presencia es esencial para la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos en numerosos tejidos, y para la captación de glucosa por el músculo y la grasa.

La **diabetes tipo 2** es una alteración del metabolismo de la glucosa que afecta al 90–95% de los pacientes con diabetes. Es de origen hereditario, pero está fuertemente asociada a factores externos; hasta el 80% de su prevalencia podría ser atribuible al efecto combinado de la inactividad y el sobrepeso [SED 2005]. La etiología precisa de la diabetes tipo 2 se ignora, aunque se conoce su relación con defectos específicos de la célula β pancreática, y con la disminución de la capacidad de acción de la insulina [Schuster 2002], o **insulinorresistencia**. La célula β de los pacientes con diabetes tipo 2 sufre una especie de ceguera específica hacia la glucosa, defecto que puede incluir, total o parcialmente, la subexpresión del gen GLUT-2, mutación del de la glucoquinasa, hiperactividad de la glucosa-6-fosfatasa, ausencia, heredada o adquirida, de la glicerolfosfato deshidrogenasa asociada al FAD mitocondrial, o hiperacumulación de glucógeno [Malaisse 1993]; a la larga, estos síntomas pueden desembocar en apoptosis de la célula β , y abocar al individuo a un estado de **diabetes tipo 1**, dependiente de la administración de insulina.

La mitad de los pacientes diabéticos tipo 2 presentan insulinoresistencia, que se expresa como la disminución de la respuesta de un tejido a la acción de la insulina, y especialmente como un descenso del transporte de glucosa y de la glucógenogénesis en el músculo y tejido adiposo, y un aumento en la producción de glucosa hepática. Es una enfermedad genética compleja que se ve agravada por factores como la edad, las hormonas sexuales (pubertad, embarazo, tratamientos anticonceptivos), la obesidad, el sedentarismo o la dieta [Oberfield 2000], y es parcialmente reversible [Groop 1993]. La insulinoresistencia asociada a obesidad parece estar causada por el exceso de grasa, especialmente a nivel visceral, la cual interfiere en la capacidad de la insulina de suprimir la lipólisis; como consecuencia, aumentan los niveles circulantes de ácidos grasos, los cuales, a su vez, empeoran la sensibilidad insulínica, por un lado, al inhibir la captación y oxidación de glucosa por el músculo esquelético, y por otro, al acelerar la gluconeogénesis hepática [Boden 1997, LeRoith 2002, Stumvoll 2005]. El resultado neto es una hiperglucemia moderada, que estimula al páncreas a producir más y más insulina; pero la célula β no puede sostener indefinidamente una producción suficiente para compensar el empeoramiento de la resistencia a la hormona, y finalmente se produce un déficit de ésta que da lugar a una alteración de la tolerancia a la glucosa que, junto con la disfunción de la célula β , puede conducir a un estado progresivo de diabetes tipo 2 [Beck-Nielsen 1994, Turner 1998].

El tratamiento de la diabetes tipo 2 pasa por conseguir un aumento en la producción, secreción y sensibilidad a la insulina. Para ello, hasta ahora se hace uso de una combinación de medicamentos antidiabéticos (sulfonilureas, biguanidas), en combinación con ejercicio y dieta, medidas, éstas últimas, que también son parte del tratamiento preventivo, y que están cobrando progresiva importancia en ambientes urbanos, donde el sedentarismo y la alimentación desequilibrada son habituales. A pesar de la importante y creciente incidencia de la insulinoresistencia, no existe un tratamiento específico para ésta, y es mucho lo que se desconoce aún sobre los detalles de esta alteración hormonal.

El GLP-1

En los años 60 se observó que el aumento de glucemia tras la ingestión de comida o la administración oral de glucosa provocaba una mayor estimulación de la secreción de insulina que la misma glucemia cuando la glucosa se administraba por vía intravenosa [Elrick 1964, McIntyre 1965]. Esto llevó a postular la existencia de agentes insulíntrópicos secretados por células intestinales en respuesta a la ingestión de nutrientes, los cuales fueron denominados **incretinas**. Se estima que sólo un tercio de la secreción de insulina se debe a la acción directa de la glucosa, y el resto a estimulación por señales neuroendocrinas [Kreyman 1987, Ahren 2004].

Son varios los neurotransmisores y hormonas entéricas con efecto incretina, pero las más importantes son, sin duda, el **GIP** (*glucose-dependent insulintropic polypeptide*) y el **GLP-1** (*glucagon-like peptide*) [Creutzfeldt 2001], enteropéptido de 36 aminoácidos con una acción insulíntrópica más potente que el primero [Kreyman 1987, Siegel 1992]. Mediante purificación y análisis secuencial de algunos de los péptidos GLP, se pudo deducir que el proceso postraduccional del proglucagón en páncreas e intestino difieren marcadamente (**Fig. 1**) [Mojsov 1986, Novak 1987]. En las células α del páncreas, el proglucagón da lugar, predominantemente, a proglucagón 1-30 – también llamado péptido pancreático relacionado con la glicentina o GRPP– [Thim 1982], proglucagón 33-61, que es idéntico al glucagón, proglucagón 64-69 [Yanaihara 1985], a un fragmento del extremo carboxi-terminal, proglucagón 72-158 [Patzelt 1984], y al proglucagón 1-61

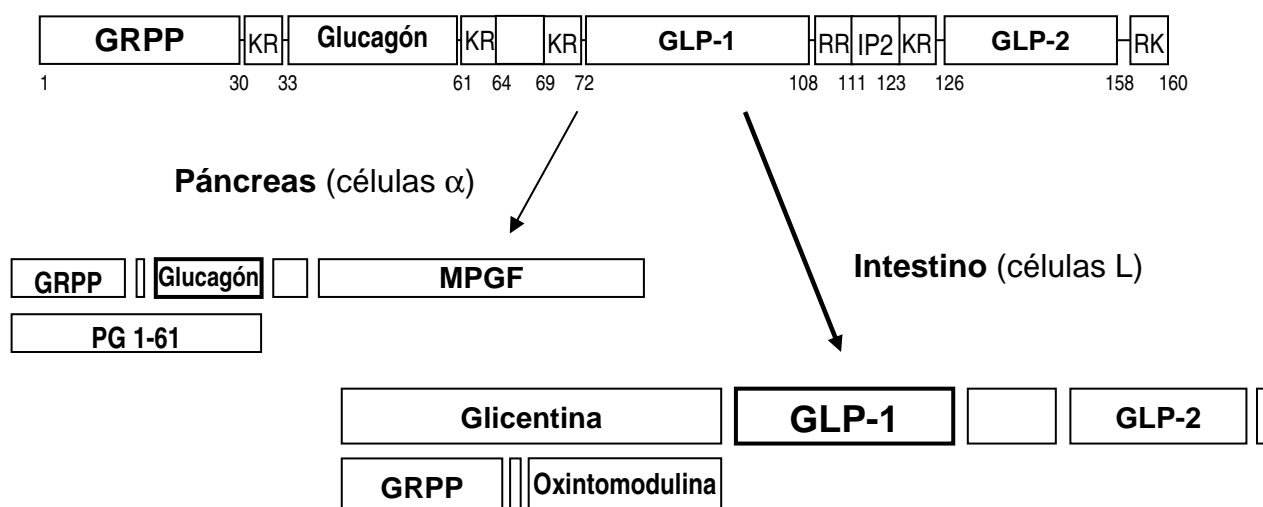


Fig. 1. Procesamiento alternativo del gen del proglucagón.

[Baldissera 1986]. En las células L del intestino, el proceso post-traducciona da lugar a proglucagón 1-69, también llamado glicentina [Thim 1981], a proglucagón 33-69 u oxintomodulina [Bataille 1982], y a GLP-1 –proglucagón 72-108– y GLP-2 –proglucagón 126-158– [Mojsov 1986, Ørskov 1986]. En el intestino de varios mamíferos, incluido el hombre, la forma truncada GLP-1(7-36)amida, o proglucagón 78-107amida, es la forma predominante [Holst 1987, Kreymann 1987, 1988, Ørskov 1986].

La estructura química del GLP-1, idéntica en varios mamíferos estudiados, incluido el hombre, coincide con la del glucagón en la posición de catorce aminoácidos [Bell 1983, López 1983], siendo las formas GLP-1(7-36)amida y GLP-1(7-37) las más activas, que a partir de ahora se denominarán simplemente GLP-1. Su secreción está inducida por la ingestión de alimentos, fundamentalmente azúcares y grasas, tanto en personas sanas [Elliott 1993, Kreyman 1987] como en pacientes diabéticos tipo 2 [Creutzfeldt 2001, Nauck 1993]. En 1987 se documentó por primera vez la capacidad del péptido para estimular la liberación de insulina [Holst 1987, Kreymann 1987]. En 1992 se vio que el GLP-1, administrado en infusión intravenosa continua en sujetos normales, disminuye los aumentos de glucosa e insulina en sangre producidos tras una comida mixta; y que, en sujetos diabéticos tipo 2 y tipo 1 mantenidos en glucemia normal mediante un páncreas artificial, reduce el requerimiento de insulina exógena [Gutniak 1992]. Las propiedades antidiabéticas del GLP-1 tienen el beneficio añadido de no producir hipoglucemia, al depender su acción insulínica de la concentración de glucosa [Faulkner 1991, Göke 1993, Komatsu 1989, Nathan 1992, Nauck 1993, Qualmann 1995, Shima 1988]. Como consecuencia, se iniciaron una serie de estudios, basados fundamentalmente en el ya demostrado efecto beneficioso del GLP-1 sobre la tolerancia a la glucosa, independiente de la insulina circulante [D'Alessio 1994, 1995, Gutniak 1992], que se centraron en su acción sobre el metabolismo de la glucosa en tejidos extrapancreáticos. Como resultado, se está llegando a una comprensión cada vez mayor de los efectos del GLP-1 en páncreas y tejidos extrapancreáticos, los cuales se resumen en la **figura 2**.

Efectos del GLP-1 en el páncreas

Tanto en sujetos normales como en pacientes con diabetes tipo 1 o tipo 2, el GLP-1 estimula la secreción de insulina, inhibe la secreción de glucagón y estimula la de

somatostatina [Creutzfeldt 1996, Holst 1987, Kreyman 1987, Komatsu 1989, Nathan 1992]; además, estimula la transcripción del gen de la insulina [Drucker 1987, Fehmann 1992], así como la supervivencia, proliferación y diferenciación de células β , productoras de insulina [Brubaker 2004, Buteau 2003, Drucker 2003].

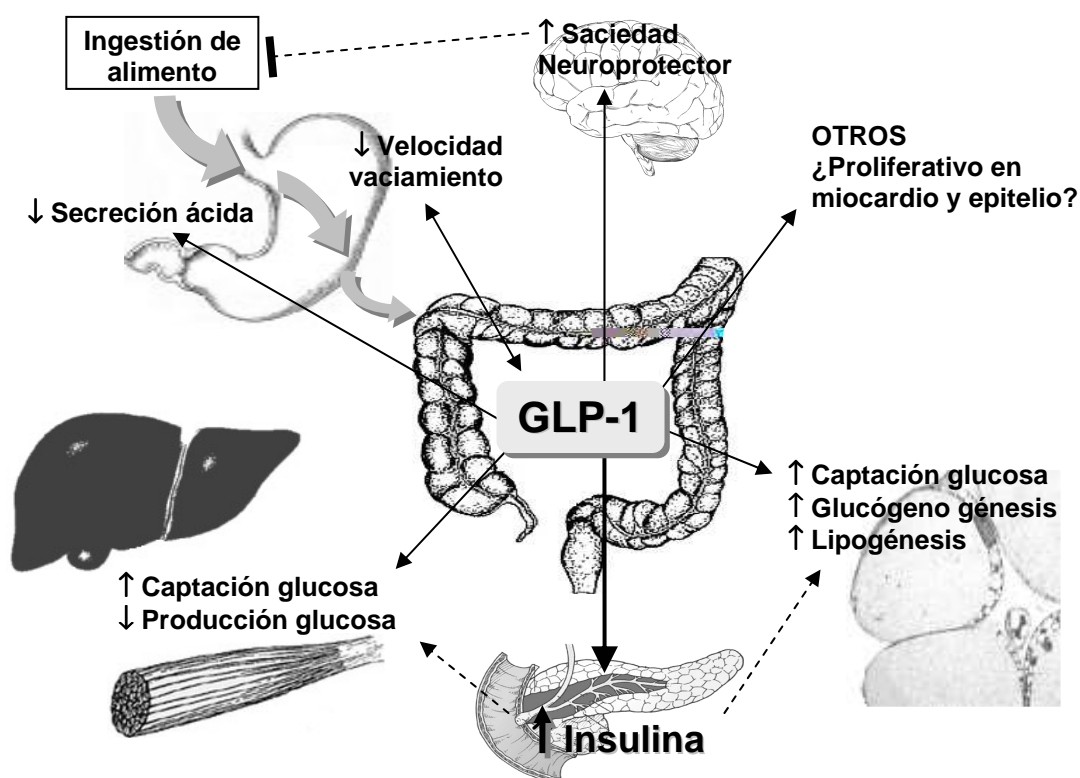


Fig. 2. Esquema de los principales efectos directos (—) e indirectos (-----) del GLP-1

Efectos extrapancreáticos del GLP-1

En el **músculo esquelético** estimula el transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno [Luque 2002, Morales 1997, Villanueva-Peñacarrillo 1994a]. En **hepatocitos** estimula la síntesis de glucógeno [Morales 1997, Valverde 1994]; en el hígado del perro, además, incrementa la captación de glucosa independientemente de la secreción de insulina [Dardevet 2004]. En **adipocitos** estimula la síntesis de glucógeno y además es lipolítico [Ruiz-Grande 1992] y lipogénico, dependiendo de la dosis [Perea 1997, Villanueva-Peñacarrillo 2001]. Además, en el adiposito del paciente obeso mórbido estimula la lipólisis, por lo que podría ser una buena herramienta terapéutica para casos extremos de obesidad

[Sancho 2006]. En estos tres tejidos, controla la expresión de los glucotransportadores, en la rata normal y diabética [Villanueva-Peñacarrillo 2001]. Se ha documentado, tanto en músculo [Delgado 1995] como en hígado [Villanueva-Peñacarrillo 1995a], la presencia de una proteína de unión para el GLP-1, probablemente distinta de su receptor en páncreas [Thorens 1992a]; en el tejido adiposo de rata y hombre también se ha detectado unión específica del péptido [Mérida 1993, Valverde 1993]. Estos efectos insulinomiméticos del GLP-1 en tejidos participantes en la absorción de la glucosa circulante pueden justificar, al menos en parte, su acción antidiabética.

En el **estómago** inhibe la secreción ácida [O'Halloran 1990, Schjoldager 1989, Wettergren 1993] y ralentiza su vaciamiento [Wettergren 1993, Willms 1996]. Tanto en pacientes afectos de obesidad mórbida [Valverde 2006] como en diabéticos tipo 2 [Berghofer 1997], la secreción de GLP-1 está disminuida; en ambas situaciones, la administración de GLP-1 puede ser beneficiosa por inducir una reducción de la ingestión de alimentos y también de la glucemia [Naslund 2004]; de hecho, cuando los pacientes obesos son sometidos a cirugía bariátrica, la secreción de GLP-1 aumenta notablemente, mejorando el metabolismo de la glucosa y el estado diabético frecuentemente asociado a la obesidad [Valverde 2005].

En el **cerebro** activa la liberación de glutamina y ácido glutámico, y controla el apetito, generando sensación de saciedad [Blázquez 1998, Calvo 1995, Flint 1998, Mora 1992, Navarro 1996, Rodríguez de Fonseca 2000, Turton 1996].

Por otro lado, se ha propuesto que la acción del GLP-1 pudiera ser eficiente en estados que cursan con deficiencia de insulina o acción alterada de ésta. De hecho, resultados obtenidos en membranas plasmáticas de tejido adiposo de pacientes con diabetes tipo 1 o tipo 2, muestran que la unión específica del GLP-1 es mayor que en el de sujetos normales de similar peso [Villanueva-Peñacarrillo 1994]; además, sugieren la presencia de un número mayor de receptores, también detectada en el hígado de un modelo experimental de diabetes tipo 1 en la rata [Valverde 1996] y en el músculo esquelético de las de tipo 1 y tipo 2 [Villanueva-Peñacarrillo 1995b], tejidos en los que el GLP-1 es glucogénico. También se ha demostrado que el GLP-1 ejerce un control modulador del glucotransportador mayoritario respectivo al hígado, músculo y grasa, a nivel de la traducción y/o postraducción, aunque su acción sobre la transcripción en el músculo y

tejido adiposo parece estar condicionada a la presencia adicional de insulina [Villanueva-Peñacarrillo 2001].

Al parecer, la acción beneficiosa del GLP-1 se extiende a sistemas más allá de los relacionados con el metabolismo del azúcar. De hecho, se ha propuesto el tratamiento con GLP-1 para enfermos de Alzheimer y otras condiciones neurodegenerativas; el GLP-1 regula la plasticidad y vida celular de las neuronas, reduce los niveles endógenos del péptido beta amiloide en el cerebro de ratón, y los de su proteína precursora en neuronas en cultivo, y protege a las neuronas de la apoptosis inducida por glutamato [Greig 2004a, Perry 2005]. También se ha notificado recientemente que la infusión de GLP-1 tras angioplastia, a pacientes con infarto agudo de miocardio y disfunción sistólica severa añadida, mejora la función global del ventrículo izquierdo [Nikolaidis 2004].

Todas estas características del GLP-1 convierten a esta hormona en una herramienta de gran potencial en el tratamiento de la diabetes tipo 2. Pero la utilización terapéutica del GLP-1 se ve entorpecida por su corta vida media en el torrente circulatorio, donde es degradado por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) [Kieffer 1995]; así, pierde sus dos aminoácidos N-terminales, transformándose en GLP-1(9-36)amida, producto de efectos fisiológicos aún dudosos [Deacon 2004, Meier 2006]. Como esto obliga a su administración en dosis parenterales muy frecuentes, se están llevando a cabo estudios, experimentales y clínicos, encaminados hacia la producción y aplicación de análogos de GLP-1 resistentes a la enzima, o bien de agentes inhibidores de la actividad de la misma (vildagliptina, sitagliptina, saxagliptina), que pueden ser administrados por vía oral [Gallwitz 2005, Gunnarsson 2006]. Además, la atención también se centra en la exendina 4 (Ex-4), un péptido agonista del GLP-1 producido por el reptil *Heloderma suspectum*. La mayor estabilidad *in vivo* de la Ex-4 respecto al GLP-1 —que puede atribuirse a la ausencia de puntos sensibles a la DPP-IV en su secuencia amino terminal [Mentlein 1999], y a su reducida susceptibilidad a degradación por endopeptidasa neutra 24.11 [Thum 2004]—, ilustra su carácter beneficioso. De momento, la Ex-4 sintética, *exenatide*, que ya se utiliza en investigación clínica como hipoglucemiante, y otros análogos del GLP-1 resistentes a la DPP-IV, como *Liraglutide*, muestran efectos

antidiabéticos muy prometedores en modelos animales de diabetes y en pacientes diabéticos tipo 2 [Bailey 2005, Degn 2004a, 2004b, Holst 2004, Holz 2003, Idris 2002, Joseph 2000].

Dieta y diabetes

La base científica de la regularización de la dieta como parte del tratamiento de la diabetes aparece al final del siglo XIX, cuando Apollinaire Bouchardat [1883] observa el aumento excesivo de la glucosuria tras la ingestión de alimentos, y la reducción de esa glucosuria tras la disminución drástica de hidratos de carbono en la alimentación; como resultado, recomendó que el paciente fuese sometido inicialmente a una dieta carente de carbohidratos, y que luego éstos se fueran incorporando hasta determinar el “umbral de tolerancia” individual. La necesidad de reducir al mínimo estricto la ingestión de azúcares, es una norma todavía vigente para muchos médicos. Ello, junto con la eliminación de azúcares simples de la dieta –preconizada 50 años más tarde–, ha llevado al paciente diabético a ser excluido de una vida social normal. Hallazgos recientes sugieren que los carbohidratos deben representar un 45-60% de las calorías totales ingeridas por día, que no todos los azúcares refinados son particularmente hiperglucemiantes, y que el uso razonado de grasas, proporciona al diabético una dieta más flexible y atractiva [Slama 2001].

En los sujetos diabéticos, la molécula de GLP-1, a diferencia del GIP, mantiene la mayor parte de su efecto insulínico, tanto a dosis farmacológicas como fisiológicas [Nauck 1993], mientras que es su nivel de secreción lo que se ve disminuido [Toft-Nielsen 2001, Vilsboll 2001]. Por lo tanto, adquiere interés el intento de estimular naturalmente la secreción endógena del péptido a través de modificaciones en el contenido de la dieta. Es importante, además, la búsqueda de nutrientes distintos a la glucosa capaces de estimular la secreción de insulina, ya sea directamente o a través de la estimulación de la secreción de GLP-1. Por ejemplo, ciertas moléculas, como el dimetil éster del ácido succínico (SAD), mejoran marcadamente el efecto insulínico del GLP-1, aun en ausencia total de glucosa [García-Martínez 2000a, Ladriere 1996], incluso en la rata diabética [García-Martínez 2000a].

La insulínorresistencia afecta de manera diferente a distintos individuos, tejidos, e incluso funciones, por lo que resulta difícil detectar efectos relacionados con cambios

dietarios. Numerosos estudios en humanos, revisados por Bessesen [2001], demuestran que una dieta rica en carbohidratos no perjudica, e incluso puede beneficiar, a la sensibilidad a insulina, mientras que sí resulta perjudicial una dieta rica en ácidos grasos saturados (SFA). Por otra parte, la reducción de ácidos grasos en la dieta puede revertir completamente la insulinoresistencia en sujetos obesos [Groop 1993], en los cuales, por cierto, se ha demostrado la existencia de efectos insulinomiméticos del GLP-1 [Egan 2002].

Resultados de investigaciones realizadas en la rata Wistar [Iritani 1999] y Zucker delgada [Rocca 2001], o en células intestinales de feto de rata [Rocca 1995], y también en el hombre normal y diabético [Thomsen 1999, 2003], sobre los efectos de la grasa en la respuesta del GLP-1 a la glucosa, o sobre la expresión del gen del proglucagón en el intestino, y sobre la utilización del azúcar, apuntan hacia un mayor beneficio de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) –como los del **aceite de oliva**– frente a los SFA. Se ha demostrado que las dietas ricas en MUFA mejoran el control glucémico y los perfiles lipídicos [Garg 1994, Low 1996, Parrillo 1992, Riccardi 1993, 2000, Wright 1998]. Low y col. comprobaron que la dieta enriquecida en MUFA incrementaba la secreción de insulina inducida por los carbohidratos. El efecto favorable de los MUFA sobre la homeostasis de la glucosa parece estar relacionado con una mayor secreción de GLP-1 [Rocca 2001].

Es bien conocido el carácter insulínico de determinados aminoácidos como la arginina [Ørskov 1991], leucina [Prieto 2003] o histidina [Leech 2003], o precursores como el succinato [Attali 2006], así como las ventajas de las dietas ricas en proteínas sobre el control del peso y la glucemia, efectos que podrían estar mediados por el GLP-1 [Aziz 2003]. Además, recientemente se ha propuesto que la ingestión de proteínas del suero lácteo bobino podría inhibir la DPP-IV hasta un 50% [Gunnarsson 2006]. Por otro lado, una dieta pobre en proteínas durante el embarazo de la rata puede originar insulinoresistencia en las crías [Dollet 1987]. Las proteínas más estudiadas son algunas de soja y bacalao [Demonty 2003], y la **caseína**. La ingestión de creatina parece afectar a la secreción de insulina, aunque no hay consenso al respecto [Newman 2003, Rooney 2002, 2003]. La caseína, la proteína mayoritaria de la leche de todos los mamíferos, es una

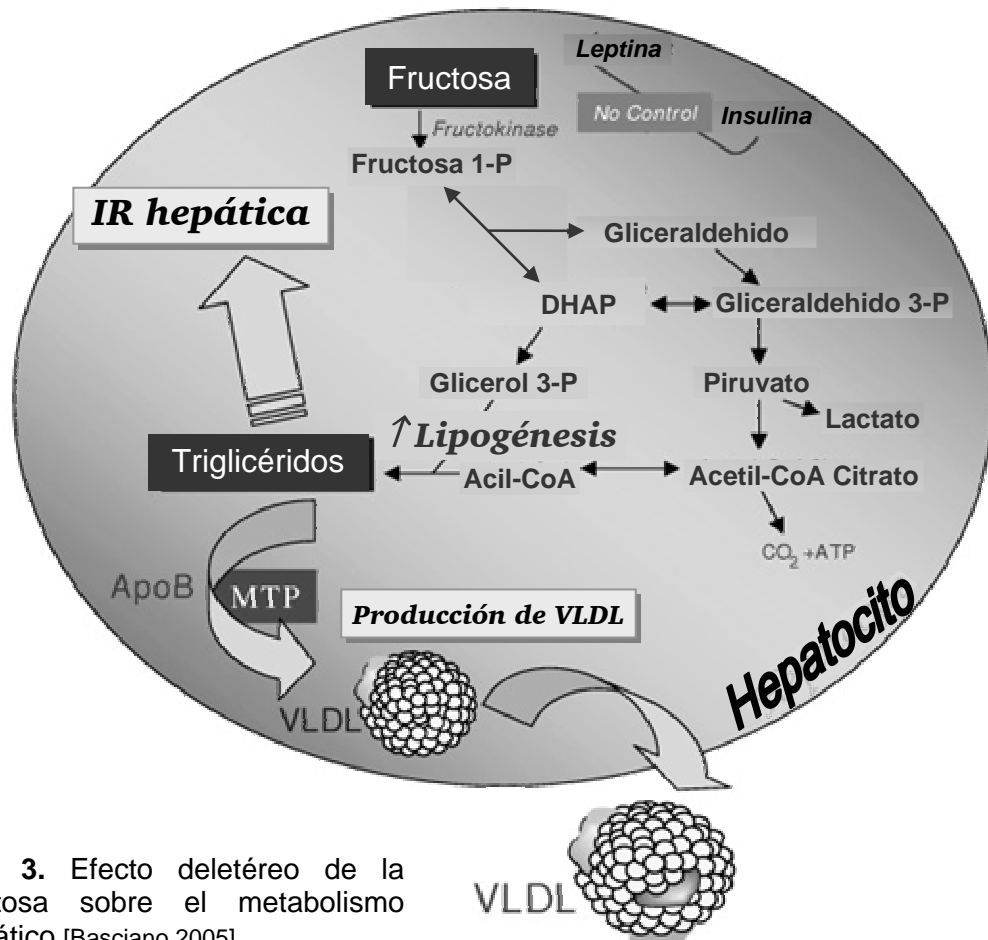
mezcla de fosfoproteínas que contiene todos los aminoácidos, y es rica en los esenciales.

La dilatación del proceso de absorción de la glucosa en el intestino delgado, mediante la administración de dietas ricas en fibra, parece no sólo potenciar sino prolongar la secreción de GLP-1, aumentar el ARNm del proglucagón en el intestino [Reimer 1996], y mejorar la tolerancia a la glucosa, efecto que se mantiene aun cuando la fibra no está ya presente. Sin embargo, se ha sugerido que el efecto de la fibra sobre la liberación de GLP-1 en respuesta a la glucosa, y sobre la expresión génica del proglucagón en el intestino, está condicionada también a su potencial grado de fermentabilidad, de forma que aquellas altamente fermentables generan, fundamentalmente en el íleon, un mayor aumento del ARNm del proglucagón en la rata [Reimer 1997] y en el perro [Massimino 1998]. La **goma de guar** es una fibra ampliamente estudiada, pues es un aditivo habitual en la alimentación humana. Con un Pm de 15.000, se compone de poli- β -1,4-mananosa; no es digerible, pero sí altamente fermentable. Se ha documentado su efecto inmediato sobre la glucosa plasmática post-*prandium* y la concentración de insulina en varios estudios en el hombre normal [Braaten 1991, Fairchild 1996, Kirsten 1991, Landin 1992, Morgan 1990, Sierra 2001, Torsdottir 1989] y diabético [Russo 2003]. De igual manera, la administración a largo plazo de guar durante 4-48 semanas en sujetos normales [Landin 1992] y diabéticos [Ebeling 1988, Groop 1993, Lafrance 1998, Vuorinen-Markkola 1992a], reduce la glucemia en ayuno, la hemoglobina A1C, el colesterol y los triglicéridos, y normaliza la presión sanguínea, la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa. En la rata normal [Begin 1989, Vachon 1988], o intolerante a la glucosa [Cameron-Smith 1997, Suzuki 2004], la adición de guar a la dieta durante 10-30 días mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina, y reduce la insulinemia post-*prandium*. Los efectos del guar son atribuibles a factores metabólicos, probablemente a través de los ácidos grasos de cadena corta producidos por la fermentación de la fibra en el colon, y físicos, como su alta viscosidad; sin duda las propiedades físicas del alimento son importantes, como muestra el hecho de que la adición de agua a la comida puede mejorar la secreción de insulina [Torsdottir 1989]. El guar mejora la secreción de GLP-1 en pacientes obesos [Dhillon 2004] y en mujeres de peso normal, pero no en hombres [Adam 2005], efecto aparentemente relacionado de forma directa con el porcentaje de grasa corporal.

Además de los nutrientes no glucídicos, existen ciertos carbohidratos con capacidad antidiabética. Los fructooligosacáridos presentes en muchas de las plantas incluidas comúnmente en la dieta (cebolla, espárrago, trigo, alcachofa, etc.), parecen tener un efecto similar al de las fibras fermentables. Estos azúcares naturales son fermentados en el ciego y colon, dando lugar a ácidos grasos de cadena corta –acetato, propionato y butirato–; la inclusión de oligofructosa en la dieta de la rata tiene un claro efecto antidiabético, probablemente mediado por GLP-1 [Cani 2006], y aumenta el contenido de éste en el ciego [Kok 1998]. La incorporación de ácidos grasos de cadena corta a una dieta parenteral estándar, en ratas normales, aumenta la expresión del gen del proglucagón en el íleon [Tappenden 1998]. Ciertos ésteres de hexosas poseen cualidades como inhibidores específicos de defectos del metabolismo de los carbohidratos, y son capaces de atravesar la membrana plasmática sin necesidad de un sistema de transporte específico, como la 6-O-acetil-D-glucosa, D-glucosa pentacetato, L-glucosa pentacetato, D-manosa pentacetato, D-fructosa pentacetato, D-galactosa pentacetato, D-glucosa pentametilsuccinato, 2-desoxi-D-glucosa tetracetato o D-manoheptulosa hexacetato. Muchos de estos ésteres han sido propuestos como posible estrategia en la terapia de la diabetes tipo 2. Todos ellos tienen una mejor metabolización y efectos biológicos más marcados que las formas no esterificadas, pudiendo incluso mostrar cierta capacidad insulino-trópica de la que carecía el carbohidrato libre [Cancelas 1999, García-Martínez 1997, Malaisse 1998, 1999a].

La **fructosa** parece afectar a las rutas metabólicas de la glucosa. Recientemente se han identificado dos nuevas modalidades de interacción entre ambas hexosas en el hepatocito y la célula β ; consisten en la capacidad de la fructosa-1-fosfato, generada por la fructoquinasa, de liberar a la glucoquinasa de la acción inhibitoria de la fructosa-6-fosfato [Malaisse 1990, Van Shaftingen 1989], y en la estimulación, por parte de la glucosa, de la fosforilación de fructosa [Moukil 2001, Scruel 1997]. Se desconoce si estas interacciones pueden afectar a la homeostasis de la glucosa tras la ingestión de azúcar. Pero la fructosa es un arma de doble filo: una ingestión excesiva puede interferir negativamente sobre la gluconeogénesis en el hígado, provocando un aumento de la lipogénesis y síntesis de ácidos grasos (**Fig. 3**), lo cual puede acabar desembocando en la generación del síndrome metabólico, incluyendo insulino-resistencia, hipertensión, etc. [Basciano 2005]. Este hecho es preocupante si tenemos en cuenta que el consumo

de bebidas y aditivos ricos en fructosa está aumentando a gran ritmo en los países industrializados.



Lo expuesto hasta aquí refleja que si bien no se conoce del todo, sí se dispone de información preliminar esencial sobre la relación entre compuestos dietéticos y síntesis y/o secreción de GLP-1 y tolerancia a la glucosa en estado normal. La documentación disponible en patologías que cursan con alteración del metabolismo de los hidratos de carbono, como la diabetes, es escasa y contradictoria [Berghofer 1997, Brubaker 1989, Kreymann 1988].

PROPÓSITO

Este trabajo pretende investigar, en la rata normal y en modelos experimentales de insulinoresistencia y diabetes tipo 2, el balance de nutrientes –carbohidratos, grasas y proteínas–, y moléculas capaces de modificar el proceso de absorción del intestino – fibras–, que, ingeridos con la dieta, estimulen la síntesis y secreción de GLP-1, y su posible relación con la tolerancia a la glucosa y la secreción de insulina.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

En todos los casos se utilizaron ratas Wistar de 200-400 g de peso, procedentes del bioterio de la Fundación Jiménez Díaz, alimentadas *ad libitum* con pienso estándar (UAR Panlab, Barcelona, España) y agua.

Rata en ayuno. Se le retiró el acceso al alimento 16–18 horas antes de cada experimento.

Rata anestesiada. Se le administró pentobarbital sódico (5% en suero salino), a una dosis intraperitoneal de 45 mg/Kg de peso corporal.

2. MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

Se generó por inyección de estreptozotocina (STZ), agente de conocida acción citotóxica, altamente específico para la célula β pancreática [Junod 1967, Portha 1979].

Reactivos

Estreptozotocina, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU*

Citrato sódico, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU*

Procedimiento

Se preparó una disolución de STZ en citrato sódico 0,05 M, a una concentración de 20 mg/ml y un pH de 4,5, que se inyectó al animal en una única dosis (100 mg/Kg de peso), intraperitonealmente, el día del nacimiento. Transcurridas 6-7 semanas, se midió en cada rata el coeficiente de utilización de glucosa.

2.1. Coeficiente de utilización de glucosa

La tolerancia al azúcar se determinó por observación del perfil de glucemia tras una sobrecarga intravenosa de glucosa [Portha 1979].

Reactivos

NaCl 0,9%, *B. Braun Surgical S.A., Barcelona, España*

Heparina 1%, *Rovi S.A., Barcelona, España*

Pentobarbital sódico (Pentothal[®]), *Abbott Laboratories S.A., Madrid, España*

D-Glucosa anhidra, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Analizador de glucemia, tiras reactivas (Acutrend[®]), *Böhringer Mannheim, Mannheim, Alemania*

Seda quirúrgica 2/0 B, *Braun Surgical S.A., Barcelona, España*

Procedimiento

A la rata en ayuno y anestesiada se le practicó un corte en el extremo de la cola para la obtención de muestras de sangre; se tomó una muestra (una gota) para determinar la glucemia basal, y seguidamente se inyectó glucosa (20% en suero salino) en unos 5 segundos, a través de la vena femoral, a razón de 500 mg/Kg de peso, volviéndose a tomar muestras de sangre 2, 5, 10, 20 y 30 minutos después. Durante los 30 minutos del experimento, el extremo de la cola se mantuvo sumergido en heparina al 0,1% en suero salino. Al finalizar, se suturó la herida con seda quirúrgica.

Los valores de glucemia, medida mediante tiras reactivas Acutrend[®], se utilizaron para la estimación del coeficiente de utilización de glucosa (K), que se calculó según la relación $[\text{Ln}2/(\text{T}_{1/2}-\text{T}_0)] \times 100$, donde T_0 es el minuto en que la glucemia alcanza el valor máximo, y $\text{T}_{1/2}$ es en el que el valor máximo ha descendido, o descendería, a la mitad. Aquellos animales que presentaban un valor de K inferior a $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, fueron considerados diabéticos, y se utilizaron para el estudio correspondiente al menos una semana después de esta prueba.

3. MODELO EXPERIMENTAL DE RESISTENCIA A INSULINA

Se generó por libre exposición de las ratas a fructosa en el agua de bebida (20% p/v) durante 60 días, tras los cuales se determinó el nivel de resistencia adquirido, como se detalla a continuación.

3.1. Medición de la resistencia a insulina (clamp)

Se determinó mediante una prueba de demanda de glucosa intravenosa, para mantener una glucemia basal y estable en situación de hiperinsulinemia constante.

Reactivos

NaCl 0,9%, *B. Braun Surgical S.A., Barcelona, España*

Heparina 1%, *Rovi S.A., Barcelona, España*

Ácido etilen-diaminotetracético (EDTA), *Merck, Darmstadt, Alemania*

Pentobarbital sódico (Pentothal®), *Abbott Laboratories S.A., Madrid, España*

D-Glucosa anhidra, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Insulina porcina, *Novo Biolabs, Bagsvaerd, Dinamarca*

Material

Tubo de polietileno (d.i.=0,58 mm, d.e.=0,97 mm), *Clay Adams, NJ, EEUU*

Tubo de silicona (Silastic®) Medical-Grade Tubing (d.i.=0,50 mm, d.e.=0,93 mm), *Down Corning, Midland, MI, EEUU*

Bombas de infusión 74900 series, *Cole-Parmer Instrument Co, Vernon Hills, IL, EEUU*

Aguja Butterfly-21 (d.i.=0,80 mm, d.e.=1,10 mm), *Abbott, Sligo, Irlanda*

Llave de tres vías Viasend, *Sendal, Saint Genis Laval, Francia*

Aguja Venoject (0,80 x 25 mm), *Teruno, Leuven, Bélgica*

Centrífuga BECKMAN GS 6R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EEUU*

Jeringas de plástico (1, 5 y 10 ml), *Becton Dickinson & Co. Ltd, Drogheda, Irlanda*

Analizador de glucemia, tiras reactivas (Acutrend®), *Böhringer Mannheim, Mannheim, Alemania*

Procedimiento

Durante el experimento, se mantuvo la temperatura corporal de la rata, en ayunas y anestesiada, mediante una lámpara de 100 W encendida a 30 cm del animal. A continuación se le practicó una traqueotomía, con el fin de prevenir accidentes respiratorios. Seguidamente se colocaron sendos catéteres, uno en la arteria carótida — para la extracción de muestras de sangre—, y otro, de doble vía, en la vena femoral izquierda, a través del cual se administraron glucosa e insulina. Con el fin de evitar obstrucciones en las cánulas, éstas fueron conectadas, para su rellenado, a una jeringa cargada con una disolución de heparina al 0,1% en suero salino.

Tras un período de reposo de 10 minutos, se administró insulina en infusión continua de 0,4 U/h/Kg, y glucosa en infusión variable, partiendo de 0,56 mmol/h/Kg, y aumentando

progresivamente hasta llegar al valor con el cual la glucemia se mantuvo estable e igual a la basal.

Las muestras de sangre (500 µl) se recogieron del catéter situado en la carótida, antes y 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos después del inicio de la prueba: El volumen total infundido fue equivalente al extraído. Se separó el plasma (M&M 10.1) para su posterior determinación de glucosa, por el método de la glucosa oxidasa, y de insulina y GLP-1 por radioinmunoanálisis (M&M 12).

4. PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA

A la rata en ayuno se le administró, por vía intragástrica, una disolución de glucosa al 20% (1,2 g/Kg de peso), y se extrajeron muestras de sangre de aproximadamente 1 ml, antes de la administración y 20, 40, 80 y 120 minutos después, en cuyo plasma, separado por centrifugación, se analizó el contenido de glucosa por el método de la glucosa oxidasa, y el de insulina y GLP-1 por radioinmunoanálisis (M&M 12).

5. DIETAS DE ESTUDIO

Los animales fueron alimentados de acuerdo a distintos protocolos (M&M 7, 8 y 9) según procedió, con las dietas que se relatan a continuación:

C (control): pienso estándar (*UAR Panlab, Barcelona, España*) sólido

Dietas para estudios en rata normal y diabética tipo 2 (tabla 1)

F: D-fructosa (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU*) al 50% en pienso estándar molido

AO: aceite de oliva virgen extra (*Dia S.A. Madrid, España*) al 6,5% (p/p) en pienso estándar sólido

G: goma de guar (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU*) al 20% (p/p) en pienso estándar molido

CA: caseína de leche bovina (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU*) al 40% (p/p) en pienso estándar molido

Tabla 1. Composición orgánica seca y poder calórico de las dietas de estudio en rata normal y diabética tipo 2

| Nutriente | C | | F | | AO | | G | | CA | | |
|----------------|--------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | Kcal/g | % Kcal/Kg | % Kcal/Kg | % Kcal/Kg | % Kcal/Kg | % Kcal/Kg | % Kcal/Kg | % Kcal/Kg | % Kcal/Kg | % Kcal/Kg | |
| Carboh. | 4 | 60,5 | 2420 | 80,3 | 3210 | 56,6 | 2263 | 48,4 | 1936 | 36,3 | 1452 |
| Lípidos | 9 | 2,9 | 261 | 1,5 | 131 | 9,2 | 829 | 2,3 | 209 | 1,7 | 157 |
| Proteína | 4 | 15,4 | 616 | 7,7 | 308 | 14,4 | 576 | 12,3 | 493 | 49,2 | 1970 |
| Fibra | 0 | 3,9 | 0 | 2,0 | 0 | 3,6 | 0 | 23,1 | 0 | 2,3 | 0 |
| Kcal/Kg | | | 3297 | | 3649 | | 3668 | | 2638 | | 3578 |

Dietas para estudios en rata normal e insulinoresistente (tabla 2)

- F** Fructosa 20% (p/v), en el agua de bebida y pienso estándar
- FO** Fructosa 20% en agua y aceite de oliva virgen extra al 15% (p/p) en pienso estándar molido
- FG** Fructosa 20% en agua y guar al 20% en pienso estándar sólido, preparado en agua destilada con 0,5% (p/v) ácido propiónico (*Scharlau, Barcelona*), y secado posteriormente durante 8 horas a 60°C

Tabla 2. Composición orgánica seca y poder calórico de las dietas de estudio en rata normal e insulinoresistente

| Nutriente | F | | O | | G | | |
|---------------|---------|----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | Kcal/Kg | % Kcal/L | % Kcal/Kg | % Kcal/Kg | % Kcal/Kg | % Kcal/Kg | |
| Carbohidratos | 4 | 20 | 1800 | 51,4 | 2057 | 48,4 | 1936 |
| Lípidos | 9 | 0 | 0 | 17,5 | 1572 | 2,3 | 209 |
| Proteína | 4 | 0 | 0 | 13,1 | 524 | 12,3 | 493 |
| Fibra | 0 | 0 | 0 | 3,3 | 0 | 23,1 | 0 |
| | | | 1800 | | 4152 | | 2638 |

6. ADMINISTRACION INTRAGASTRICA

Se utilizaron 18 grupos de ratas normales tras ayuno nocturno de 16-18 horas, a las que se administraron los siguientes bolos por entubación intragástrica:

Fructosa intragástrica

- agua
- suero salino (NaCl, 0,6 mmol/Kg de peso corporal)
- glucosa 0,4 M (1,7 mmol/Kg)
- glucosa 0,9 M (3,5 mmol/Kg)
- glucosa 1,7 M (6,7 mmol/Kg)
- glucosa 2,2 M (8,9 mmol/Kg)
- glucosa 3,5 M (13,9 mmol/Kg)
- fructosa 1,7 M (6,7 mmol/Kg)
- fructosa 0,4 M + glucosa 0,4 M (1,7 mmol/Kg, de cada)
- fructosa 0,9 M + glucosa 0,9 M (3,5 mmol/Kg, de cada)
- sacarosa 0,9 M (3,7 mmol/Kg)

Aceite de oliva intragástrico

- C: glucosa 1,7 M (6,7 mmol/Kg)
- G_{8,9}: glucosa 2,2 M (8,9 mmol/Kg)
- O₄: aceite de oliva (3,7 g/Kg), en bolo de 4 ml/Kg
- O₆: aceite de oliva (3,7 g/Kg), en bolo de 6 ml/Kg
- C+O₄: aceite de oliva (3,7 g/Kg) + glucosa 3,3 M (6,7 mmol/Kg), en bolo de 4 ml/Kg
- C+O₆: aceite de oliva (3,7 g/Kg) + glucosa 3,3 M (6,7 mmol/Kg) en bolo de 6 ml/Kg

Guar intragástrico

- glucosa 1,7 M (6,7 mmol/Kg)
- guar al 1% p/v (40 mg/Kg)
- guar 1% (40 mg/Kg) + glucosa 1,1 M (4,4 mmol/Kg)

Materiales y reactivos

NaCl 0,9%, *B. Braun*

D-glucosa anhidra, *Merck, Darmstadt, Alemania*

D-fructosa, *Sigma Aldrich, St Louis, MO, EEUU*

Sacarosa, *Sigma Aldrich, St Louis, MO, EEUU*

Aceite de oliva, *Dia S.A. Madrid, España*

Guar, *Sigma Aldrich, St Louis, MO, EEUU*

Caseína, *Sigma Aldrich, St Louis, MO, EEUU*

Jeringas de plástico (1, 5 y 10 ml) y sonda intragástrica, *Becton Dickinson & Co. Ltd, Drogheda, Irlanda*

Procedimiento

En todos los casos, la administración se realizó en un bolo de 4 ml/Kg de peso en 5 segundos. En el caso del aceite de oliva, se repitieron las sobrecargas añadiendo 2 ml/Kg de agua al bolo. Antes y 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de cada administración, se extrajeron muestras de sangre de aproximadamente 1 ml, en cuyo plasma, separado por centrifugación, se analizó el contenido de glucosa por el método de la glucosa oxidasa [Bergmeyer 1974], de glucosa y fructosa por el de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PdH) [Lowry 1972], y de insulina, glucagón y GLP-1 por radioinmunoanálisis (M&M 12).

7. PRUEBA DE RESPUESTA INMEDIATA A LA DIETA

La intención fue determinar el efecto de la dieta de estudio, ingerida en mayor cantidad posible y en poco tiempo (15 minutos); y con el fin de conseguirlo, la rata hubo de ser entrenada previamente. Para ello, durante 14 días, el animal se mantuvo en ayuno desde las 18:00 hasta las 14:00 horas del día siguiente, excepto los 15 minutos comprendidos entre las 10:30 h y las 10:45 h, en los que se le permitió libre acceso al pienso estándar, que el día 15 se sustituyó por el tipo de dieta a estudiar en cada caso. Antes y 10, 40, 80 y 120 minutos después de la ingestión, se extrajeron muestras de sangre de aproximadamente 1 ml, en cuyo plasma, separado por centrifugación, se analizó el contenido de glucosa por el método de la glucosa oxidasa, y de insulina y GLP-1 por radioinmunoanálisis.

8. TRATAMIENTO CRONICO: RATA NORMAL Y DIABETICA

La extensión de esta prueba, en la que las ratas fueron expuestas libre y únicamente a cada dieta específica, fue de 50 días; en ella participaron también parte de los animales procedentes del estudio de respuesta inmediata a la dieta (M&M 5). En todo el proceso, se realizó un seguimiento del peso del animal, cantidad de alimento ingerido, y glucosa, insulina y GLP-1 en plasma, antes de empezar el tratamiento y los días 4, 11, 19, 27,

36 y 50 después de su inicio. Además, todos los animales fueron sometidos a dos pruebas de tolerancia a la glucosa, una el día 19 y otra el 36. El día 50, tras ser sacrificada la rata, se recogió el páncreas y el intestino (M&M 10) para la extracción y determinación del contenido en insulina y GLP-1, respectivamente (M&M 11 y 12). A menos que se indique lo contrario, todas las variables fueron medidas tras ayuno nocturno.

9. TRATAMIENTO CRONICO: RATA INSULINORRESISTENTE

Las ratas fueron expuestas libremente a la dieta C, F+M, o F+G (M&M 5), durante 60 días. En todo el proceso, se realizó un seguimiento del peso del animal, cantidad de alimento ingerido y glucosa, insulina y GLP-1 en plasma. Al final del tratamiento, cada animal se sometió a una prueba de demanda de glucosa para determinar su nivel de resistencia a insulina (M&M 3.1).

10. MUESTRAS DE ESTUDIO

En todos los animales se estudió el contenido en glucosa, insulina, GLP-1 y/o glucagón, según procedió, en el plasma, en el páncreas, y también en el intestino, el cual se segmentó en cuatro porciones: yeyuno, íleon, ciego y colon (Fig. 4). Se determinó su contenido en glucosa —por el método de la glucosa oxidasa—, y de insulina, glucagón y GLP-1 —por radioinmunoanálisis, M&M 9—.

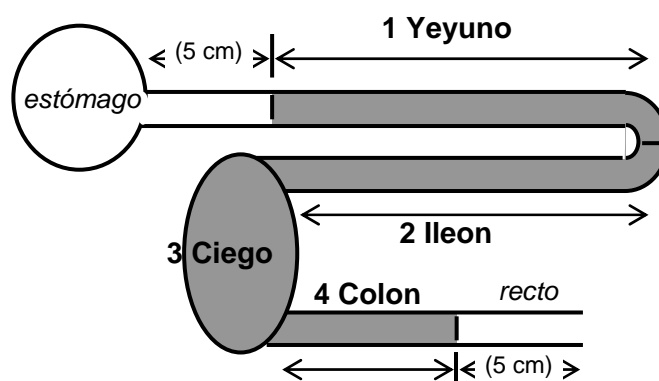


Fig. 4. Segmentación del intestino en cuatro partes (en gris)

En el caso del GLP-1, y para evitar interferencias con proteínas plasmáticas en la determinación, y por otro lado concentrar la muestra, fue necesaria su extracción previa del plasma (M&M 11).

10.1. Plasma

La sangre se recogió (M&M 6 y 7) en tubos que contenían 25 µl de ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA) y aprotinina, 500 unidades inhibitoras de calicreína (UIC); el plasma se separó de la fracción celular por centrifugación (15 minutos, 2.500 rpm, 4°C), y se conservó a -20°C para la posterior determinación de su contenido en glucosa, insulina, glucagón y GLP-1.

10.2. Páncreas e intestino

El páncreas se recogió y pesó en una sola pieza, y los segmentos de intestino se lavaron con suero salino. Todas las piezas se conservaron a -70°C hasta ser sometidas al proceso de extracción de insulina y GLP-1, respectivamente, para su ulterior medida.

11. EXTRACCION DE HORMONAS

Se extrajo la insulina del páncreas, y el GLP-1 del plasma y del intestino para su cuantificación.

11.1. Extracción de insulina del páncreas

El contenido pancreático de insulina se recuperó por extracción ácido-alcohólica [Jackson 1969].

Materiales y reactivos

Sonicador B-12, *Branson Sonic Power Company, Danburg, CO, EEUU*

Ácido acético, *Scharlau, Barcelona, España*

Etanol, *Scharlau, Barcelona, España*

KOH, H₃PO₄, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Concentrador SPEED-VAC, *Savant Instruments Inc., Farmingale, NY, EEUU*

Albúmina bovina (BSA), *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU*

Centrífuga GS-6R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EEUU*

Procedimiento

Una porción de unos 100 mg de tejido, procedente de la totalidad del páncreas previamente triturado, se incorporó a 2 ml de mezcla extractiva (etanol 65%, ajustado el pH a 2,8 con H₃PO₄), y se disgregó en frío durante 2-3 minutos por sonicación, a 50 W,

hasta obtener una suspensión homogénea. Tras 24 horas a 4°C, la mezcla se sonicó de nuevo 1 minuto, y a continuación se centrifugó 10 minutos a 2.500 rpm. El sedimento se disolvió en 1 ml de KOH 0,5N. Tras recoger un pequeño volumen del sobrenadante para la determinación de su contenido en proteínas [Bradford 1976], el resto se secó en un Speed-Vac y se conservó a -20°C hasta la determinación posterior de la concentración de insulina (M&M 12).

11.2. Extracción de GLP-1 del intestino

El GLP-1 se recuperó de los segmentos de intestino mediante tratamiento con ácido acético [Lütticken 1993]

Materiales y reactivos

Sonicador B-12, *Branson Sonic Power Company, Danburg, CO, EEUU*

Ácido acético, *Scharlau, Barcelona, España*

Liofilizador Benchtop 3L, *Virtis, Gardener, NY, EEUU*

Albúmina bovina (BSA), *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU*

Centrífuga GS-6R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EEUU*

Procedimiento

Se tritura el tejido en agua hirviendo (5 ml/g de peso) y se incuba 5 minutos a 100°C. Se añade ácido acético (final 0,5 M) y se sonica 1 minuto a 50 W. Tras incubar 18 h a 4°C se centrifuga (30 minutos, 17.000 g), se extrae el sobrenadante y se vuelve a centrifugar. El nuevo sobrenadante se utiliza para determinar proteínas o se liofiliza y se mantiene a -20°C para la posterior determinación de GLP-1.

11.3. Extracción de GLP-1 del plasma

El GLP-1 se recuperó del plasma por tratamiento con etanol [Ørskov 1991].

Materiales y reactivos

Etanol, *Scharlau, Barcelona, España*

Liofilizador Benchtop 3L, *Virtis, Gardener, NY, EEUU*

Centrífuga GS-6R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EEUU*

Procedimiento

En un tubo a 4°C se prepararon 800 µl de plasma por grupo de ratas, tomando porciones iguales de cada animal; se añadieron 1,95 ml de etanol al 99% y se incubó una hora a 4°C. Tras centrifugar (15 minutos, 3.000 rpm, 4°C) se tomaron 2 ml del sobrenadante, se liofilizaron y se conservaron a -20°C. La recuperación de GLP-1 por este método es de aproximadamente el 60%.

12. DETERMINACIONES HORMONALES

La medida del contenido en insulina, GLP-1 y glucagón, tanto en el plasma como en los extractos de intestino o páncreas procedentes de los distintos experimentos, se realizó por radioinmunoanálisis, según se describe a continuación.

12.1. Insulina

a) Producción de ¹²⁵I-insulina

La insulina se marcó radiactivamente con ¹²⁵I-Na, por el método de la cloramina T, según la técnica descrita por Greenwood y col. [Greenwood 1963].

Reactivos

Insulina porcina, *Novo BioLabs, Bagsvaerd, Dinamarca*

¹²⁵I-Na, *Amersham International, Buckinghamshire, Reino Unido*

Cloramina-T, *Sigma, St. Louis, MO, EEUU*

NaH₂PO₄·H₂O, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Na₂HPO₄·2H₂O, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Glicina, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Albúmina bovina (BSA), *Instituto Grifols, S.A., Barcelona, España*

Ácido tricloroacético (TCA), *Merck, Darmstadt, Alemania*

Tampón PO₄³⁻ 0,4 M, pH 7,2.

TCA al 10%

Material

Columna 0,5x1 cm de acetato de celulosa Sep-Pak C18, *Millipore, Milford, Massachussets, EEUU*

Contador gamma PC-RIA, *MAS STRATEC, Bruselas, Bélgica*

Procedimiento

Se utilizó una mezcla de 10 µg de la hormona y 1 mCi de ^{125}I , que se trató con 0,4 µg de cloramina-T, en un volumen total de 100 µl de PO_4^{3-} 0,4 M, pH 7,2, durante 30 segundos a 25°C, hasta conseguir un 50-60% de incorporación de ^{125}I a la molécula, lo cual se comprobó mediante la precipitación, con TCA 5% (final), del contenido radiactivo de una pequeña parte de la mezcla de reacción. El resto de la mezcla se hizo pasar a través de una columna de acetato de celulosa, según el método descrito por Yallow y Berson [Yallow 1960]. Mediante lavados con tampón de glicina sin albúmina se eliminó tanto el exceso de yodo como los posibles productos de degradación, mientras que el péptido intacto se desprendió y recuperó con albúmina humana al 15%.

b) Análisis cuantitativo**Reactivos**

^{125}I -insulina, producción propia

Disoluciones patrón de insulina de rata, *Novo Biolabs, Bagsvaerd, Dinamarca*

Suero de cobaya anti-insulina, producción propia

Glicina, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Carbón activado Norit CA 1, *Sigma, St. Luis, MO, EEUU*

Dextrano T70, *Pharmacia, Uppsala, Suecia*

Medio de análisis

Glicina 0,2 M, pH 8,8, BSA 0,25%

Material

Carbón activado Norit CA 1, *Sigma, St. Luis, MO, EEUU*

Dextrano T70, *Pharmacia, Uppsala, Suecia*

GLUCOSE ANALYZER 2, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EEUU*

Centrífuga GS-6R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EEUU*

Contador gamma PC-RIA.MAS, *STRATEC, Bruselas, Bélgica*

Procedimiento

Una vez añadidos, y bien mezclados, todos los componentes del sistema radioinmunológico – ^{125}I -insulina (50 pg), patrón de insulina de rata (0-20 ng/ml) o la muestra de plasma objeto de análisis (5-50 µl), y suero anti-insulina GP-25 a la dilución final de 1:100.000–, en un volumen total de 1,0 ml de medio de análisis, los tubos se

mantuvieron durante 3 días a 4°C, tiempo en el cual la reacción alcanza su equilibrio. Después de este período, se procedió a la separación del complejo antígeno-anticuerpo del antígeno libre, mediante la absorción de este último con carbón activado (3%) y saturado con dextrano (0,25%) [Herbert 1965]. El proceso de separación por carbón saturado con dextrano se favorece en presencia de una determinada cantidad de proteínas, las cuales actúan como soporte del complejo antígeno-anticuerpo; inmediatamente antes de la adición de la mezcla carbón-dextrano (0,5 ml), se añadieron 50 µl de plasma humano normal a la curva patrón, y el volumen complementario a las muestras de plasma que estaban siendo analizadas en cantidades inferiores a 50 µl. Las muestras fueron entonces centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, después de lo cual se descartó el sobrenadante, permaneciendo en el tubo el sedimento de carbón con el péptido libre. La radiactividad absorbida por el carbón se midió en un contador gamma, y se calculó, en cada caso, el porcentaje de péptido radiactivo unido, frente al de las tratadas con carbón-dextrano que no contenían anticuerpo.

12.2. Glucagón

Se utilizó ¹²⁵I-glucagón –como trazador radiactivo–, y un suero anti-glucagón (30K), generosamente donado por el Dr. R.H. Unger.

a) Producción de ¹²⁵I-glucagón

El glucagón se marcó radiactivamente con ¹²⁵I-Na, por el método de la cloramina-T, según la técnica descrita por Greenwood y col. [Greenwood 1963].

Reactivos

Glucagón porcino cristalino, *Eli Lilly, Indianapolis, IN, EEUU*

¹²⁵I-Na, *Amersham International, Buckinghamshire, Reino Unido*

Cloramina-T, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU*

NaH₂PO₄·H₂O, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Na₂HPO₄·2H₂O, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Glicina, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Albúmina bovina (BSA), *Instituto Grifols, S.A., Barcelona, España*

Ácido tricloroacético (TCA), *Merck, Darmstadt, Alemania*

Ácido trifluoroacético, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Acetonitrilo, *Scharlau, Ferosa, Barcelona, España*

Dietilamina, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Aprotinina (Trasylo[®]), *Bayer, Leverkusen, Alemania*

Disoluciones

Tampón PO₄³⁻ 0,4 M, pH 7,2

TCA 10%

Glicina-albúmina: glicina 0,2 M, pH 8,8, HSA 0,5%

Material

Sistema HPLC, *Millipore, Massachusetts, EEUU*

Columna 0,5x1 cm de acetato de celulosa Sep-Pak C18, *Millipore, Milford, Massachusetts, EEUU*

Contador gamma PC-RIA.MAS, *STRATEC, Bruselas, Bélgica*

Procedimiento

Básicamente, 10 µg de glucagón, mezclado con 0,5 mCi de ¹²⁵I-Na, fue tratado con 5 µg de cloramina-T, en 60 µl de 0,4 M PO₄³⁻, pH 7,4, durante 10-20 segundos, a temperatura ambiente, hasta conseguir un 45-60% de incorporación de ¹²⁵I a la molécula, lo cual se comprobó mediante la precipitación, con TCA al 5% (final), del contenido radiactivo de una pequeña parte de la mezcla de reacción. Para finalizar, se añadieron 20 µl de Na₂S₂O₅ y 50 µl de KI, ambos preparados en 0,4 M PO₄³⁻, pH 7,4, a la concentración de 10 mg/ml. A continuación, se diluyó la muestra hasta 1 ml con glicina-albúmina.

Para la purificación del ¹²⁵I-glucagón, la mezcla radiactiva recién preparada se cargó en la columna de acetato de celulosa, y tras la eliminación del ¹²⁵I libre –por elución con tampón glicina–, el resto se recuperó con etanol al 70%. Para aislar el mono-¹²⁵I-glucagón, parte del purificado se sometió a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), a gradiente desde 20% a 50% de fase orgánica, y a un flujo de 1 ml por minuto durante 45 minutos en columna µBondapak C18 de 3,9x300 mm. La fase acuosa fue trifluoroacético al 0,1%, a pH 2,5 (ajustado con dietilamina), y la orgánica, acetonitrilo. Finalmente, se eligió la fracción monoyodada, y el cálculo de la concentración del producto obtenido se hizo en base a esta característica. Al péptido purificado se le

añadió Trasylol® (1.300 UIC/ml), y se distribuyó en pequeños volúmenes, que se conservaron liofilizados y a -20°C.

b) Análisis cuantitativo

Reactivos

Mono-¹²⁵I-glucagón, producción propia

Disoluciones patrón de glucagón porcino cristalino (0-400 pg/ml), *Eli Lilly, Indianapolis, IN, EEUU*

Suero anti-glucagón 30K, cedido por el Dr. R.H. Unger, *Dallas, EEUU*

Glicina, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Albúmina bovina (BSA), *Instituto Grifols, S.A., Barcelona, España*

Aprotinina (Trasylol) 100.000 UIC/ml, *Bayer, Leverkusen, Alemania*

Carbón activado, Norit CA 1, *Sigma, St. Louis, MO, EEUU*

Dextrano T70, *Pharmacia, Uppsala, Suecia*

Medio de análisis

Glicina 0,2 M, pH 8,8, BSA 0,5%

Material

Centrífuga GS.6R, *Beckman Instruments, España, S.A.*

Contador gamma PC-RIA.MAS, *STRATEC, Bruselas, Bélgica*

GLUCOSE ANALIZER 2, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EEUU*

Procedimiento

En el tubo de ensayo, se mezclaron 8 pg de ¹²⁵I-glucagón y 500 UIC de aprotinina (50 µl de Trasylol®), con glucagón cristalino porcino como patrón de referencia (0-2.000 pg) –o 200 µl de plasma–, y con el antisuero 30K a la dilución final de 1:150.000, en 1,2 ml totales de tampón glicina; la mezcla se mantuvo a 4°C durante 4 días. Finalizado el período de estabilización de la reacción, se procedió a la separación del glucagón unido al anticuerpo del péptido libre, mediante tratamiento de la muestra con carbón saturado con dextrano (500 µl de 0,5% carbón y 0,25% dextrano en glicina 0,2 M, pH 8,8). Se añadieron 100 µl de plasma humano a la curva patrón, inmediatamente antes de la adición de la mezcla carbón-dextrano. Las muestras fueron entonces centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, después de lo cual, la fracción líquida fue descartada, permaneciendo en el tubo el sedimento de carbón con el péptido libre. La radiactividad absorbida por el carbón se midió en un contador gamma,

y se calculó, en cada muestra, el porcentaje de glucagón radiactivo unido frente al presente en las tratadas con carbón-dextrano, que no contenían anticuerpo.

12.3. GLP-1

a) Producción de ^{125}I -GLP-1

Se preparó en nuestro laboratorio por la técnica de la cloramina T descrita por Greenwood y col. [Greenwood 1963], y posterior purificación por HPLC [Trapote 1992].

Reactivos

GLP-1(7-36)amida humano sintético, *Bachem Feinchemicalen, Laussane, Suiza*

^{125}I -Na, *Amersham International, Buckinghamshire, Reino Unido*

Cloramina-T, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU*

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, *Merck, Darmstadt, Alemania*

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Glicina, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Albúmina bovina (BSA), *Instituto Grifols S.A., Barcelona, España*

Ácido tricloroacético (TCA), *Merck, Darmstadt, Alemania*

Ácido trifluoroacético, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Acetonitrilo, *Scharlau, FEROSA, Barcelona, España*

Dietilamina, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Disoluciones

Tampón PO_4^{3-} 0,4 M, pH 7,2

TCA 10%

Glicina-albúmina: glicina 0,2 M, pH 8,8, HSA 0,5%

Material

Sistema HPLC, *Waters, Massachusetts, EEUU*

Columna Sep-Pak C18, *Waters, Massachusetts, EEUU*

Contador gamma PC-RIA.MAS, *STRATEC, Bruselas, Bélgica*

Procedimiento

Básicamente, una mezcla de 10 μg de GLP-1, con 0,8 mCi de ^{125}I Na se trató con 4 μg de cloramina-T, en 48 μl de PO_4^{3-} 0,3 M, pH 7,4, durante 10-20 segundos a 22°C, hasta conseguir un 45-60% de incorporación de ^{125}I a la molécula, lo cual se comprobó

mediante precipitación, con TCA al 5% (final), del contenido radiactivo de una pequeña parte de la mezcla de reacción. Para finalizar, se añadieron 0,3 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ y 0,3 mg de KI, en respectivos 30 μl de PO_4^{3-} 0,3 M, pH 7,4. A continuación, se diluyó la muestra hasta 1 ml con PO_4^{3-} 0,3 M, pH 7,4, que contenía albúmina humana al 0,5%.

El GLP-1, una vez marcado, se sometió a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en una columna en columna $\mu\text{Bondapak C18}$ de 3,9x300 mm, con gradiente de acetonitrilo (28%-49%) en ácido trifluoroacético al 0,1%, con el fin de recuperar la fracción monoyodada de GLP-1, cuyo cálculo de concentración se basó en esa característica. El péptido purificado se distribuyó en pequeños volúmenes y se conservó liofilizado a -20°C .

El contenido de GLP-1 en el plasma se determinó según el método descrito por Ørskov y Holst [Ørskov 1987], con algunas modificaciones, por extracción previa del péptido con etanol al 70%. Se utilizó mono[^{125}I]-GLP-1 preparado en nuestro laboratorio y suero anti-GLP-1 que nos fue generosamente proporcionado por el Dr. J.J. Holst (Copenhague, Dinamarca).

b) Análisis cuantitativo

Reactivos

Mono ^{125}I -GLP-1

Disoluciones patrón de GLP-1(7-36)amida humano sintético (0-30 ng/ml), *Bachem Feinchemicalen, Laussane, Suiza*

Suero anti-GLP-1 (#2135), donado por Dr. J.J. Holst, *Copenhague, Dinamarca*

Albúmina bovina (BSA), *Grifols, Barcelona, España*

Aprotinina (Trasylol®) 10.000 UIC/ml, *Bayer, Leverkusen, Alemania*

Glicina, *Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemania*

Carbón activado, Norit CA 1, *Sigma, St. Louis, MO, EEUU*

Dextrano T70, *Pharmacia BioProcess Technology AB, Uppsala, Suecia*

Medio de análisis

Glicina 0,2 M, pH 8,8, HSA 0,5%

Material

Centrífuga BECKMAN GS-6R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, MO, EEUU*

Contador de radiactividad gamma PC-IRA.MAS, *Stratec, Gewerbest, Alemania*

Procedimiento

El contenido de GLP-1 se determinó según el método descrito por Ørskov y Holst [Ørskov 1987], con algunas modificaciones. El vehículo utilizado fue glicina 0,2 M, pH 8,8, con HSA al 0,5%. En el tubo de ensayo, y en un volumen final de 0,4 ml, se incorporó 1 fmol de [¹²⁵I]GLP-1, patrón de GLP-1(7-36)amida [0-1,5 ng] o muestra problema, el antisuero (dilución final 1:50.000), y 500 UIC (50 µl) de Trasyol®, y la mezcla se mantuvo durante 4 días a 4°C. Tras ello, el péptido no unido al anticuerpo se separó por tratamiento con una suspensión de carbón activo al 0,5% saturado en dextrano al 0,25%, en un volumen de 0,5 ml, y posterior centrifugación [Herbert 1965]. La radiactividad contenida en el sedimento se midió en un contador de radiación gamma, y se calculó, en cada muestra, el porcentaje de glucagón radiactivo unido frente al presente en las tratadas con carbón-dextrano, que no contenían anticuerpo.

13. ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados están expresados como la media ± el error estándar de la media (EEM), junto con el número de observaciones (n). La significación estadística de la media ($p < 0,05$) de los incrementos fue valorada por análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS).

Las áreas de concentración fueron calculadas por planimetría, según la fórmula:

$$\text{Area} = \frac{1}{2} \sum_{1 \rightarrow N} [(x_n - x_{n-1})(y_n + y_{n-1})], \quad \text{donde } N \text{ es el número de puntos de la curva.}$$

El área incremental (Δ área) es igual a: área total – $x_N y_0$. El **índice insulinogénico** es igual a: concentración de insulina / concentración de glucosa (nmol/mol). El **I/G** (nmol/mol) es igual a: área de insulina (pM) / área de glucosa (mM). El **HOMA** (*homeostatic metabolic assessment*) **basal** (μM^2) es igual a: concentración de insulina (nM) x concentración de glucosa (mM), en ayunas. El **HOMA post-prandium** es el incremento medio de los valores HOMA tras la sobrecarga oral de glucosa.

RESULTADOS

1. RATA NORMAL

Se analizó el efecto de la fructosa, aceite de oliva, goma de guar y caseína, administrados intragástricamente, o en combinación con la dieta, de forma aguda o crónica, sobre el peso, cantidad de alimento ingerido, tolerancia a la glucosa, secreción de insulina y GLP-1, contenido pancreático de insulina (R, 4) e intestinal de GLP-1 (R, 5).

1.1. Respuesta inmediata a fructosa intragástrica

Se estudió el efecto de la administración de varias concentraciones de glucosa, sola o combinada con fructosa, y también de suero salino (control). Observamos que los niveles plasmáticos tanto de glucosa como de fructosa fueron similares en todos los casos, independientemente del método utilizado para su determinación, glucosa oxidasa o G6PdH (M&M, 6). En el grupo control, tratado con salino, el incremento del área (Δ área) de glucosa durante los 120 minutos que duró la prueba, fue nulo; con el aumento progresivo de la concentración de glucosa administrada (**Fig. 5**), se produjo un lógico y proporcional incremento del Δ área de glucosa en plasma ($r=0,95$), y también del de insulina ($r=0,91$).

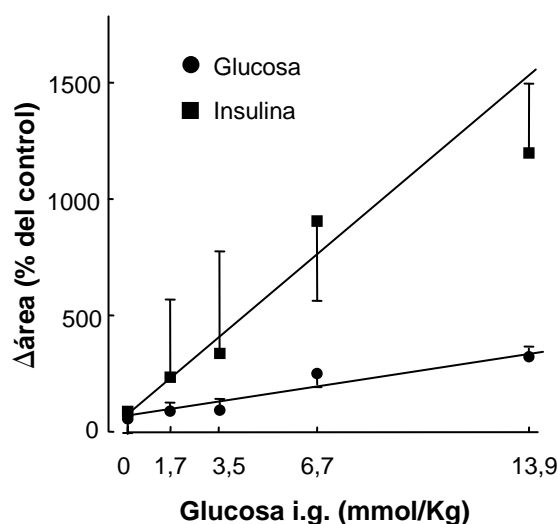


Fig. 5. Δ área de glucosa e insulina tras administración intragástrica de glucosa, en la rata normal ($n=19$ ratas).

La **figura 6** muestra la glucosa e insulina plasmáticas tras la administración de glucosa, fructosa o sacarosa. El Δ área de glucosa en el grupo que recibió glucosa intragástrica a razón de 3,5 mmol/Kg de peso fue indistinta ($p>0,29$) de la del que recibió la misma cantidad de glucosa combinada con otro tanto de fructosa.

Si bien la respuesta secretora de la célula β fue aparentemente la misma tras glucosa o glucosa+fructosa, los resultados sugieren una influencia de la fructosa en al respuesta

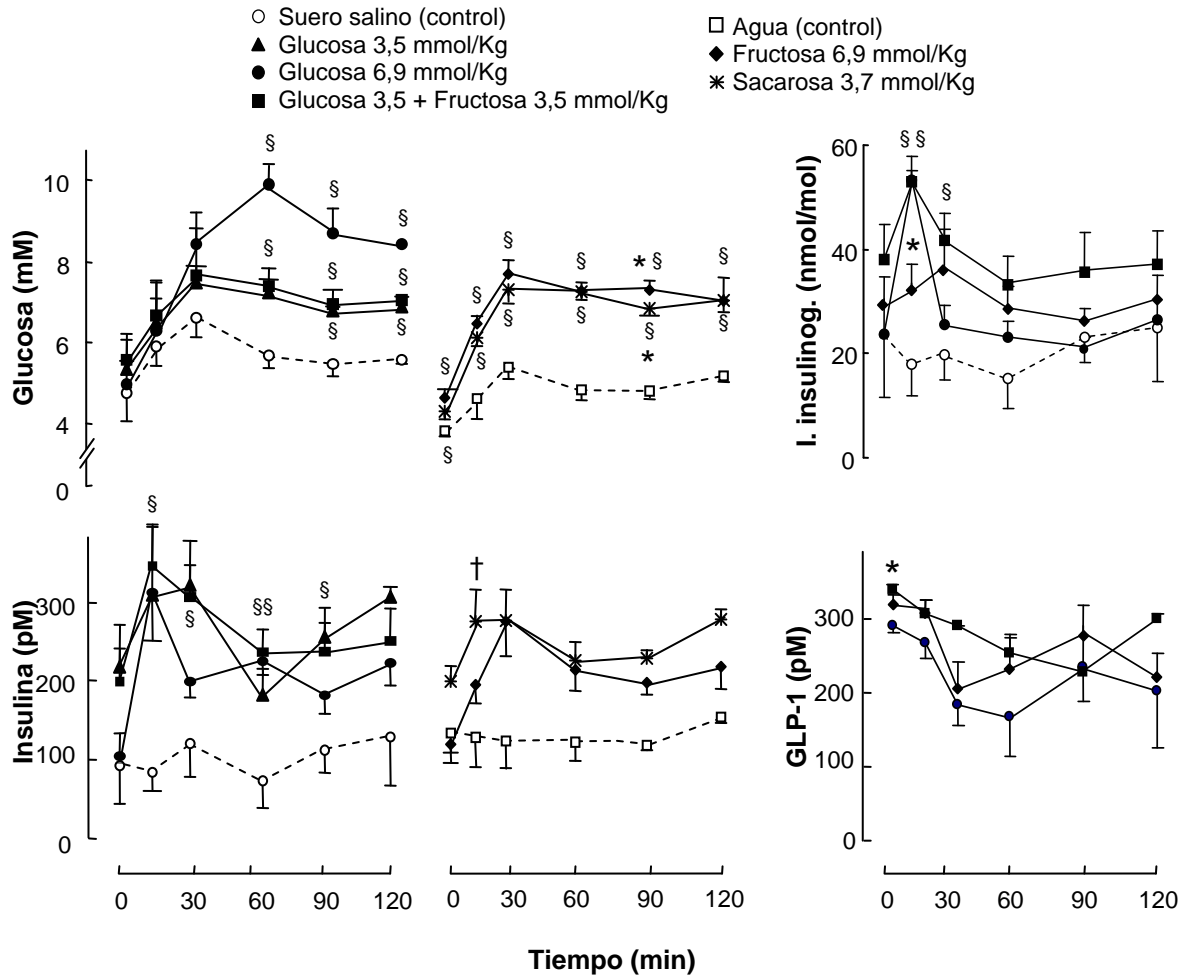


Fig. 6. Glucosa, insulina, GLP-1 plasmáticos e índice insulinogénico, tras la administración intragástrica de carbohidratos, en la rata normal (media±EEM, n=3-4 individuos); $p < 0,05$ vs * glucosa, § control, † fructosa.

insulínica a la glucosa, ello en base a que el área media de insulina tras glucosa a 3,5 mmol/Kg de peso fue similar a la obtenida tras la administración de la misma cantidad de hexosa repartida entre glucosa y fructosa ($32,1 \pm 3,8$ vs $24,9 \pm 2,5$ nmol·min, n=4); como también se observa en el caso de la administración de glucosa a 6,9 mmo/Kg de peso o glucosa+fructosa ($26,5 \pm 0,1$ vs $32,1 \pm 4,5$ nmol·min). Por otro lado, llama la atención que, en los animales que recibieron concentraciones crecientes de glucosa (Fig. 7a), la recta de regresión obtenida entre los valores individuales del área de insulina y los de glucosa proporciona una correlación significativa ($p < 0,05$), y que la

media del I/G (área de insulina / área de glucosa) fue mayor ($p < 0,001$) cuando el bolo estaba en parte compuesto por fructosa ($45,9 \pm 5,2$ nmol/mol, $n=8$, **fig. 7b**) que de sólo glucosa ($26,4 \pm 2,2$ nmol/mol, $n=19$, **fig. 7a**).

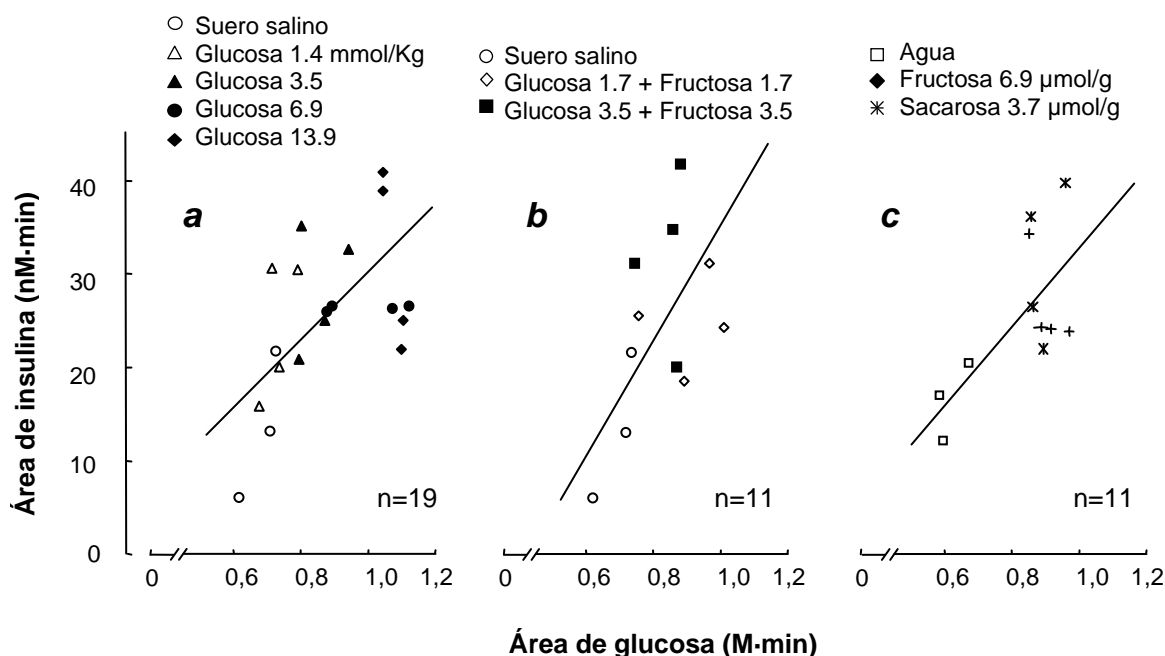


Fig. 7. Correlación entre las áreas de insulina y de glucosa tras la administración intragástrica de diferentes carbohidratos a la rata normal, y rectas de regresión resultantes.

Además, se comparó el efecto de la administración intragástrica de fructosa y sacarosa (**Tabla 3**) frente a la de agua (control). Observamos que la fructosa ($6,7$ mmol/Kg) incrementa el área de glucosa plasmática en el $248 \pm 21\%$ del control ($p < 0,01$), y que los valores, tanto del área como del Δ área fueron ligera pero no significativamente menores que los obtenidos con sólo glucosa. La fructosa provocó un aumento ($p < 0,001$) de la fructosa plasmática, con un máximo de $2,9 \pm 1,7$ mM en el minuto 60 (**Fig. 8**). El Δ área de fructosa tras el bolo de fructosa fue 181 ± 23 mM·min, el doble del obtenido tras sacarosa ($n=4$, $p < 0,005$). Sorprende que, en el grupo que recibió sacarosa ($3,7$ mmol/Kg), el área de glucosa fue menor que la del grupo con sólo fructosa, y también fue el $71 \pm 3\%$ del que recibió $6,9$ mmol/Kg de glucosa ($n=4$), a pesar de la cantidad ligeramente mayor de hexosa administrada ($7,3$ mmol/Kg), y de que, una vez metabolizada, la mitad de la sacarosa es ya glucosa. Tanto la fructosa como la

sacarosa indujeron un aumento de la insulina plasmática ($p < 0,05$ vs control), sin diferencias apreciables entre el grupo de fructosa y el de sacarosa (**Fig. 7c**).

Tabla 3. Δárea e I/G tras administración intragástrica de diferentes carbohidratos, en la rata normal (media±EEM, n =número de individuos).

| | n | Δárea | | |
|------------------------|-----|-----------------------|-------------------|-------------------------|
| | | Glucosa (mM·min) | Fructosa (mM·min) | Insulina (nM·min) |
| Agua (control) | 3 | 141 ± 35 | - | 16,8 ± 2,4 |
| Fructosa (6,9 mmol/Kg) | 4 | 349 ± 30 ^b | 181 ± 23 | 26,9 ± 2,6 ^a |
| Sacarosa (3,7 mmol/Kg) | 4 | 293 ± 13 ^b | 93 ± 40 | 31,4 ± 4,1 ^a |

^a: $p < 0,05$ ^b: $p < 0,01$, vs control

| | n | I/G (nmol/mol) |
|---|-----|-------------------------|
| Glucosa (1,4-13,9 mmol/Kg) | 16 | 28,5 ± 1,7 |
| Glucosa+Fructosa (1,7 o 3,5 mmol/Kg, de cada) | 8 | 45,9 ± 5,2 ^c |
| Glucosa (0-13,9 mmol/Kg) | 22 | 37,7 ± 2,9 |
| Fructosa (6,9 mmol/Kg) | 16 | 44,3 ± 3,0 |
| Sacarosa (3,7 mmol/Kg) | | |
| Glucosa + Fructosa (1,7 o 3,5 mmol/Kg, de cada) | | |
| | | |

^c: $p < 0,001$ vs glucosa

En las ratas que recibieron sólo fructosa (6,9 mmol/Kg), el I/G fue casi idéntico al del grupo que recibió glucosa+fructosa (3,5 mmol/Kg de cada), con valores respectivos de 39,9±4,7 y 39,6±5,2 nmol/mol ($n=4$), y también aparentemente igual al que recibió glucosa (35,7±3,0 nmol/mol, $n=4$) o sacarosa (45,9±5,5 nmol/mol, $n=4$) a 6,9 mmol/Kg de peso.

Al agrupar los valores disponibles, el I/G resultó ser 37,7±2,9 nmol/mol para las 22 ratas que recibieron sólo glucosa, y 44,3±3,0 nmol/mol para las 16 que recibieron fructosa, fuera ésta sola, mezclada con glucosa, o en forma de sacarosa.

El GLP-1 plasmático tras la administración de la

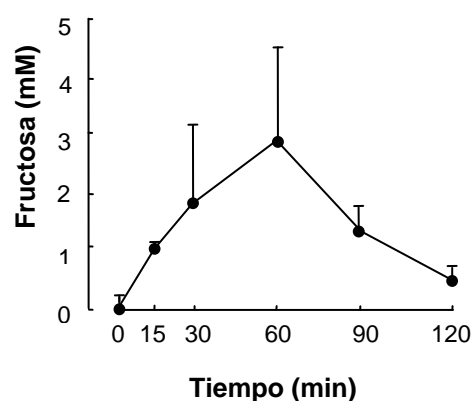


Fig. 8. Fructosa plasmática tras fructosa (6,9 mmol/Kg) intragástrica, en la rata normal (media±EEM, $n=8$ individuos).

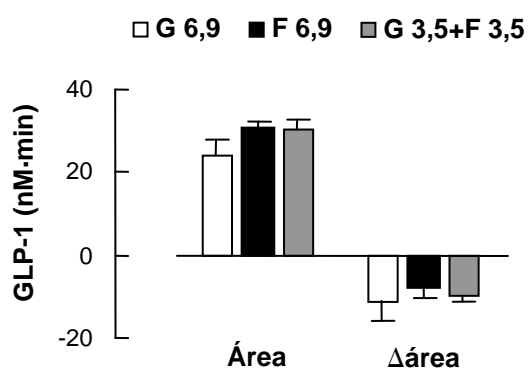


Fig. 9. Áreas de GLP-1 plasmático tras la administración intragástrica de glucosa y/o fructosa, en la rata normal (media±EEM, n=3-4 individuos).

hexosa a 6,9 mg/Kg de peso, sorprendentemente se mantuvo, durante los 120 minutos de la prueba, por debajo de la basal. Si bien la concentración media de GLP-1 antes y durante la prueba fue similar tras glucosa, fructosa o glucosa+fructosa, el descenso de GLP-1, sin embargo, tendió a atenuarse tras fructosa, ya fuera sola o mezclada con glucosa. El área de GLP-1 (**Fig. 9**) tras fructosa, ya sea sola o acompañada de

glucosa, fue aparentemente mayor que tras glucosa sola.

1.2. Respuesta al tratamiento crónico con fructosa

Al inicio, el peso medio del grupo alimentado durante 50 días (M&M, 8) con pienso combinado con fructosa (F) fue significativamente mayor que el de las ratas que recibieron sólo pienso estándar (C), aunque ambos estaban dentro del mismo rango de edad. Durante el tratamiento, la cantidad de alimento ingerido, ya fuera peso o calorías, fue menor en el grupo F (ambos, $p < 0,02$). El incremento de peso del grupo F (**Fig. 10**)

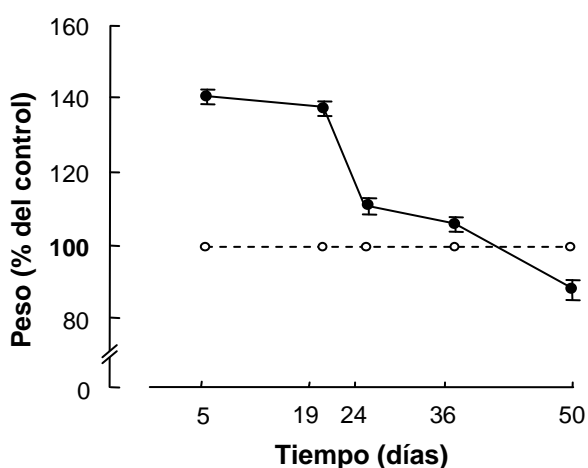


Fig. 10. Evolución del peso corporal de la rata normal a lo largo del tratamiento crónico con dieta F (—●—) con respecto a la dieta estándar C (- -○- -). Media±EEM, n=6-8 individuos.

fue tan sólo el $34 \pm 6\%$ ($p < 0,001$) del de C (67 ± 13 g, n=8 vs 200 ± 22 g, n=6), aun incluso en función de las calorías ingeridas, las cuales resultaron tan sólo la mitad ($47 \pm 9\%$) de las de C. La glucosa e insulina en plasma, cuyos valores fueron inicialmente similares en C y F, pasaron a ser mayores en F ($p < 0,04$ o menor, vs C) tras 36 días de tratamiento; esto hizo que el valor de HOMA de F fuera, en ese momento, el $325 \pm 61\%$ ($p < 0,01$, n=5-8) del de C.

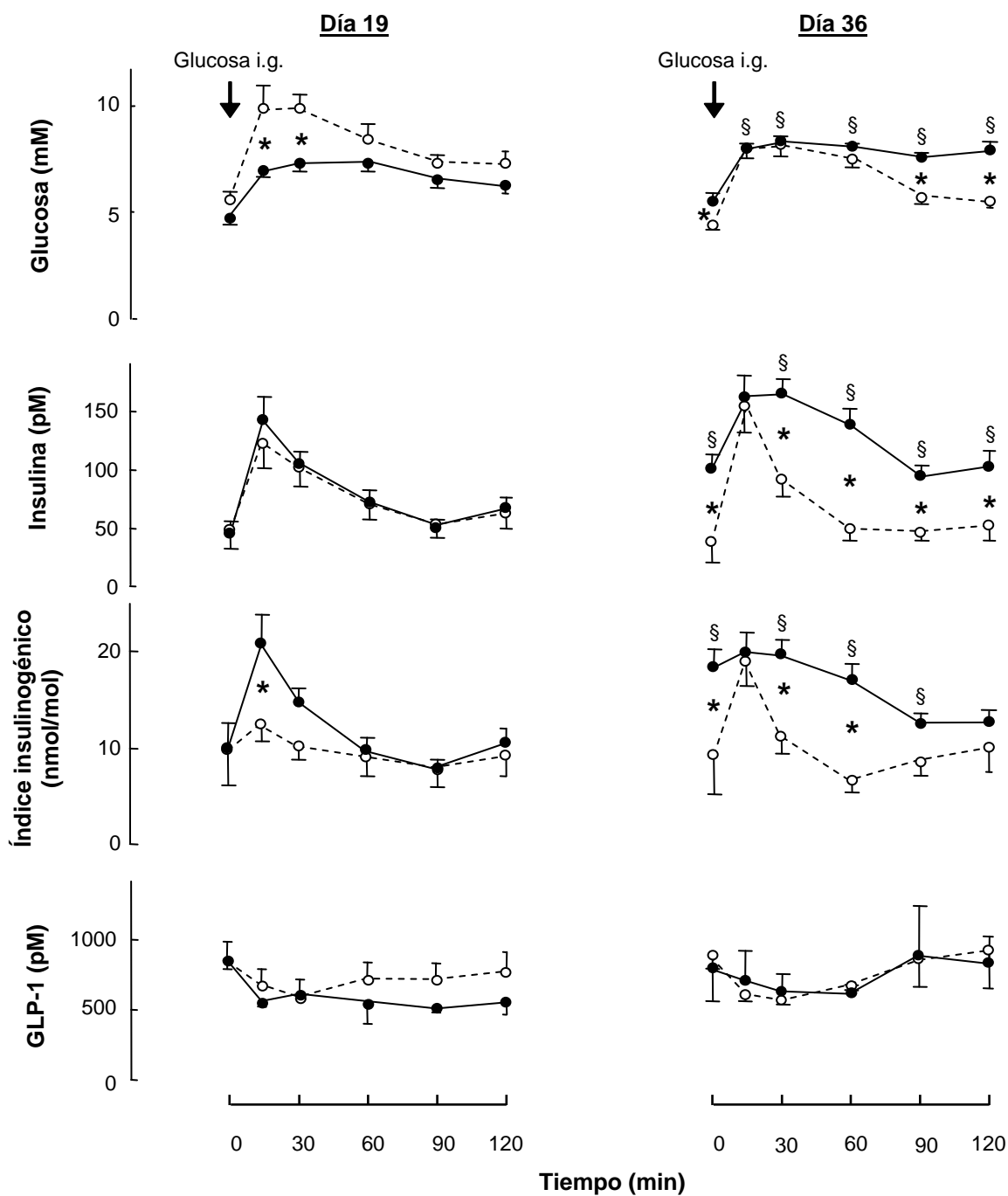


Fig. 11. Respuesta a una sobrecarga intragástrica de glucosa en la rata normal en ayunas alimentada durante 19 o 36 días con dieta estándar, C (---○---) o estándar con fructosa, F (—●—). Media±EEM, n=2–8 individuos; *: $p < 0,05$ vs C, §: $p < 0,05$ vs F día 19.

Tolerancia a glucosa intragástrica

Se sometió a los grupos C y F a sobrecarga intragástrica de glucosa en ayunas, a los 19 ó 36 días de tratamiento. Tras 19 días de tratamiento con fructosa, los valores plasmáticos de glucosa e insulina en ayunas (basales) fueron similares a los del grupo C, alimentado con pienso estándar (**Fig. 11**); sin embargo, tras 36 días, los niveles de ambos parámetros, especialmente los de insulina, fueron mayores ($p<0,04$ o menor); además, la insulina resultó ser casi el triple ($p<0,005$) que la del día 19, y el índice insulinogénico correspondiente fue también más de tres veces el del grupo C ($p<0,001$), y casi el doble del obtenido tras 19 días de tratamiento ($p<0,03$). La glucosa plasmática a lo largo de los 120 minutos que duró la prueba, fue menor en el grupo alimentado con F durante 19 días, que en el C, alcanzando significación estadística a los 15 y 30 minutos; no ocurrió así en el caso de la insulina, cuyos valores individuales fueron casi idénticos a los del grupo C. El día 36, sin embargo, la concentración de glucosa plasmática fue siempre la misma o mayor en el grupo F ($p<0,001$ a partir del minuto 90, $n=14$), y la respuesta de insulina pareció estar potenciada y prolongada con respecto al grupo C, en el cual, la respuesta fue aguda, con un incremento máximo en el minuto 15, seguido de un rápido descenso.

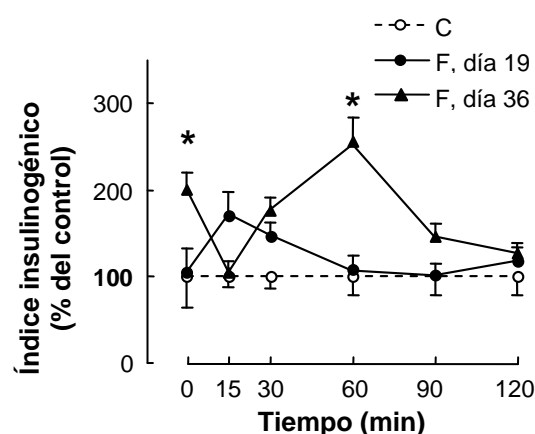


Fig. 12. Índice insulinogénico tras glucosa intragástrica, en la rata normal sometida a tratamiento crónico con dieta F, relativo a dieta estándar C (media±EEM, $n=5-11$ individuos); *: $p<0,05$ vs C.

En el grupo F, por el contrario, la concentración de insulina fue siempre mayor que en el grupo C en casi todos los puntos de la curva ($p<0,05$ a partir del minuto 30, $n=28$), y la concentración media a lo largo de la prueba también fue mayor ($p<0,001$, $n=39$). Cuando el resultado se normaliza respecto a la media del grupo C, la insulina media del F no fue distinta del C el día 19; sin embargo, tras 36 días, el valor sufrió un incremento de $95\pm 12\%$ sobre C ($p<0,001$, $n=48$).

El Área del índice insulinogénico el día 19 en el grupo F fue mayor ($p<0,05$) que en el C, pero no así día 36. No se detectaron diferencias en el índice insulinogénico medio (**Fig. 12**) entre los animales alimentados con F o C durante 19 días; pero el día 36 éste

fue mayor en el grupo F, ya fuera respecto a C ($p<0,01$) o respecto al día 19 ($p<0,01$, $n=6-8$). Tras 19 días de tratamiento, no se modificó ni el valor de HOMA basal ni post-*prandium* del grupo F (**Fig. 13**) respecto al de C, mientras que tras 36 días con fructosa, el basal fue $325\pm 61\%$ de C, y $292\pm 15\%$ (ambos, $p<0,01$, $n=8$) del correspondiente al día 19.

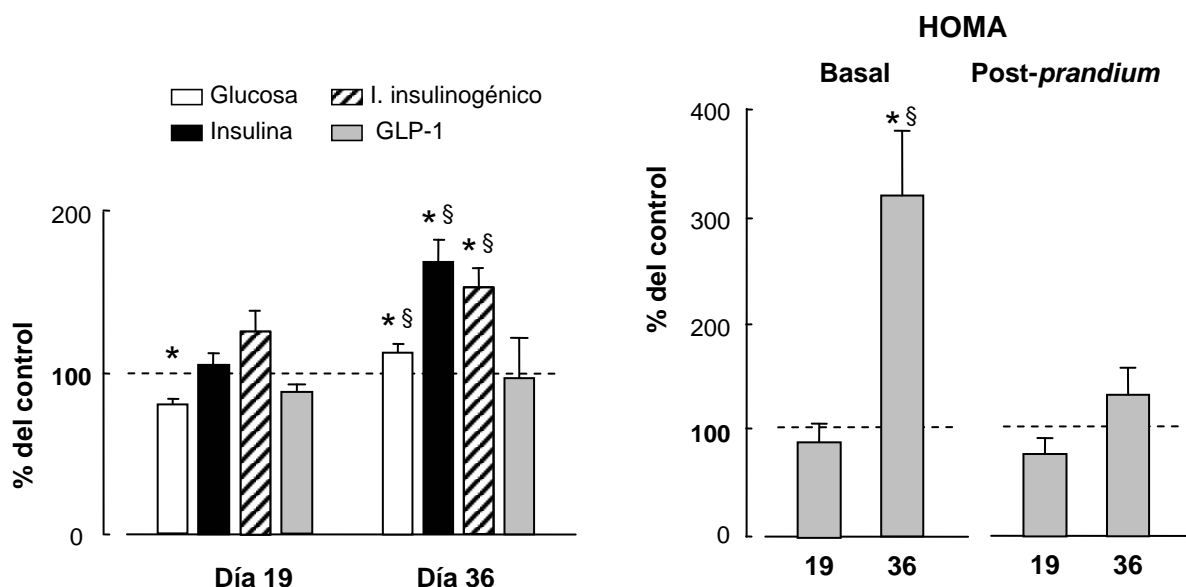


Fig. 13. Glucosa, insulina y GLP-1 plasmáticos, e índice insulínogénico (izquierda), y HOMA (derecha), en la rata normal sometida a tratamiento crónico con dieta F, relativo a dieta estándar C (media \pm EEM, $n=5-8$ individuos); *: $p<0,01$ vs C, §: $p<0,01$ vs F día 19.

1.3. Respuesta inmediata a aceite de oliva intragástrico

En esta parte del estudio se incluyeron seis grupos distintos de ratas, a los que se administró, respectivamente, glucosa y aceite de oliva en distintas proporciones y volumen: glucosa 6,7 mmol/Kg (control, C, $n=8$ ratas), glucosa 8,9 mmol/Kg ($G_{8,9}$, $n=5$), aceite de oliva 3,7 g/Kg/4 ml H_2O (AO_4 , $n=5$), aceite de oliva 3,7 g/Kg/6 ml H_2O (AO_6 , $n=5$) y glucosa + aceite de oliva ($C+AO_4$, $n=9$ y $C+AO_6$, $n=5$). El peso medio conjunto de todos ($n=37$) los animales en ayunas al inicio de la prueba fue 268 ± 7 g; la glucosa plasmática basal fue $4,7\pm 0,1$ mM; la insulina plasmática fue 46 ± 3 pM.

La glucosa intragástrica provocó, tanto en el grupo C como en $G_{8,9}$, un aumento de la concentración plasmática de glucosa e insulina ($p<0,001$), bien expresado como incremento medio o como Δ área (**Fig. 14 y 15**), que fueron proporcionales a la cantidad

Aceite de oliva intragástrico en la rata normal

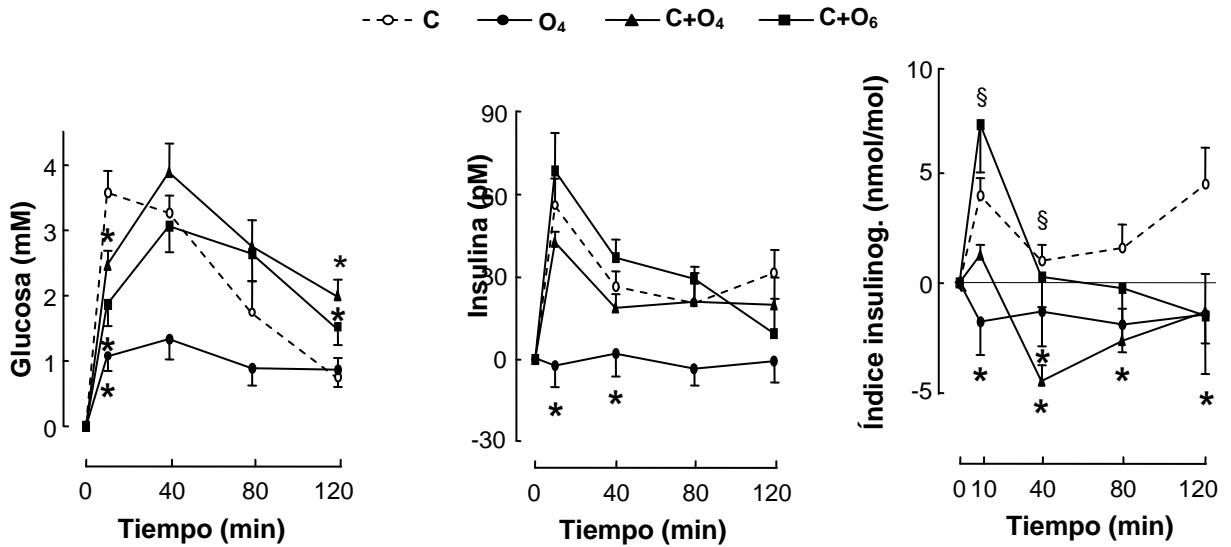


Fig. 14. Incrementos pareados de glucosa, insulina e índice insulínico tras la administración intragástrica de varios volúmenes de glucosa (C), aceite de oliva (O₄) o ambos (C+O_{4,6}), en la rata normal (media±EEM, n=5-9 individuos); *: $p < 0,05$, C+O_{4,6} vs C, §: $p < 0,05$, C+O₆ vs C+O₄.

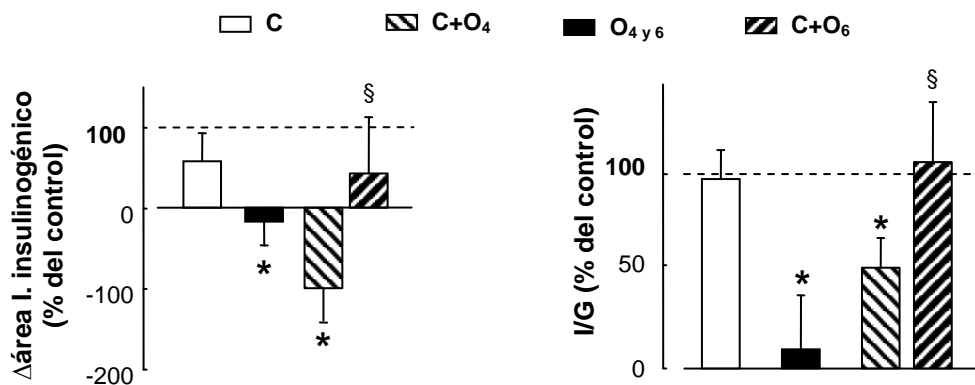


Fig. 15. Índice insulínico e I/G tras administración intragástrica de glucosa (control C), aceite de oliva (O) o ambos (C+O₄, C+O₆), en la rata normal (media±EEM, n=5-9 individuos); *: $p < 0,05$ vs control; §: $p < 0,05$ vs O₄.

de glucosa administrada. En el grupo con mayor cantidad de glucosa (G_{8,9}), el Δárea del índice insulínico fue la mitad de la de C, mientras que su valor de HOMA post-prandium resultó ser 147±23% del de C (n=5-8).

El aceite de oliva (grupos O₄ y O₆) no produjo modificación alguna en las concentraciones de glucosa ni en las de insulina respecto a valores basales, ni tampoco afectó al índice insulinogénico.

La mezcla de aceite y glucosa (C+O) redujo ($p<0,002$) el incremento de glucosa plasmática observado en el grupo C a los 10 minutos, sin modificar sensiblemente la respuesta post-*prandium* de insulina; ni el Δ área del índice insulinogénico ($p<0,006$ vs C) ni el valor de HOMA post-*prandium* ($p<0,003$ vs C) fueron distintos de 0.

Sin embargo, parece que el volumen del bolo sí afectó al valor de prácticamente todos los parámetros estudiados. El grupo C+O₄ presentó una tendencia a valores más altos de glucosa y menores de insulina plasmática, que el C+O₆ grupo que tomó la misma cantidad de glucosa y aceite, pero en 6 ml/Kg; como consecuencia, el Δ área del índice insulinogénico de C+O₄ dio un valor negativo, mientras que el de C+O₆ no sólo fue positivo, sino similar al de las ratas del grupo C. En cuanto al I/G, las ratas C+O₆ recuperaron el valor del grupo C, que no se había alcanzado, sin embargo, en el grupo C+O₄.

1.4. Respuesta inmediata a la ingestión de pienso estándar + aceite de oliva

En esta parte del estudio se incluyeron dos grupos de ratas, subdivididos en machos y hembras, que tuvieron acceso libre pero limitado en el tiempo (15 minutos), a pienso estándar solo (grupo control, C) o combinado con 6,5% de aceite de oliva (AO).

Durante el entrenamiento previo (M&M, 5), la cantidad de pienso ingerido en 15 minutos aumentó, en 10 días, desde $2,7\pm 0,2$ g/rata a $5,8\pm 0,3$ (n=8), que fue el resultado de un descenso en las dos primeras jornadas, seguido de un aumento hasta el séptimo día; a partir de ese momento, se mantuvo estable.

El día de la prueba, el peso en ayunas de la rata macho fue 244 ± 6 g (n=8), y el de la hembra, 190 ± 5 g (n=8). En ningún caso, el peso difirió entre C y AO, como tampoco lo hicieron las concentraciones plasmáticas en ayunas iniciales de glucosa, insulina y GLP-1 en ninguno de los cuatro grupos, con una media conjunta de $5,4\pm 0,1$ mM (n=16), 117 ± 10 pM (n=16) y 840 ± 58 pM (n=4), respectivamente.

Durante los 120 minutos siguientes (**Fig. 16**) a la ingestión, la presencia de aceite no afectó a la respuesta de glucosa o insulina en plasma, ni al índice insulinogénico, pero sí aumentó significativamente ($p<0,05$) la del GLP-1 en los primeros 20 minutos.

El valor de HOMA post-*prandium* en AO fue $56\pm 14\%$ del C en el caso de las hembras ($p<0,05$, $n=4$), pero no varió en el de los machos, ni tampoco al considerar, conjuntamente, a ambos subgrupos.

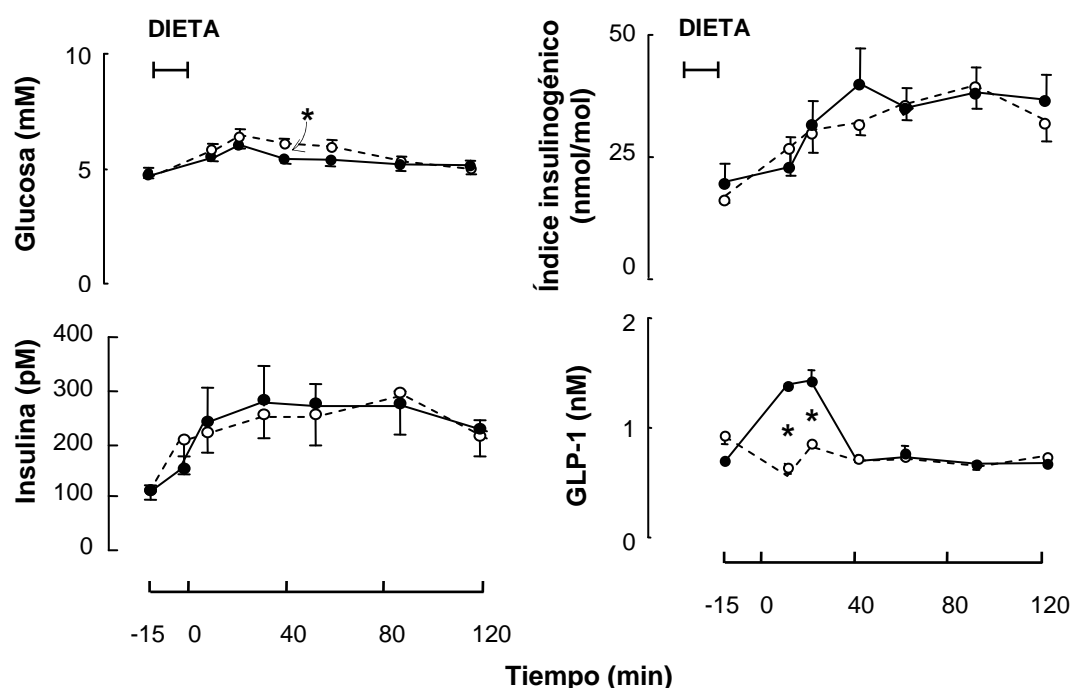


Fig. 16. Efecto inmediato de dieta estándar, C (---○---) o estándar con aceite de oliva, AO (—●—), sobre la glucosa, insulina y GLP-1 plasmáticos, e índice insulinogénico, en la rata normal (media \pm EEM, $n=8-9$ individuos); *: $p<0,05$ vs C.

1.5. Respuesta al tratamiento crónico con aceite de oliva

En esta parte del estudio se incluyeron dos grupos de ratas, subdivididos en machos y hembras, a los que se alimentó, durante 50 días (M&M 8), con pienso estándar solo, (grupo control, C) o combinado con 6,5% de aceite de oliva (AO). El peso medio conjunto de los cuatro grupos ($n=17$) en ayunas al inicio de la prueba fue 216 ± 8 g; la glucosa plasmática basal fue $5,4\pm 0,1$ mM; la insulina plasmática fue 118 ± 9 pM; en ningún caso se observaron diferencias entre ninguno de los grupos.

El aumento de peso en AO (**Fig. 17**) fue un $42,1 \pm 8,7\%$ ($n=7-8$) mayor ($p<0,02$) que el del grupo C, sin que se detectara diferencia entre géneros.

La glucosa plasmática (**Tabla 4**) no sufrió variación ($p>0,4$) a lo largo del tratamiento con ninguno de los dos tipos de dieta, con un valor medio conjunto de $6,69 \pm 0,14$ mM ($n=17$) el día 4, y $6,81 \pm 0,14$ ($n=16$) mM el día 50.

Tampoco la insulina se modificó en ningún caso; sin embargo, el valor medio fue ligeramente mayor en AO, representando un $112,6 \pm 4,7\%$ de C ($n=32$, $p<0,06$). La media del índice insulinogénico en el grupo AO ($n=32$) fue $120,1 \pm 3,9\%$ de C ($p<0,05$), independientemente del sexo del animal.

El HOMA basal de C, que inicialmente no difería del de AO, descendió el día 19, pero se recuperó el día 36 hasta el valor de partida. En el grupo AO, el HOMA basal también sufrió un descenso, que en este

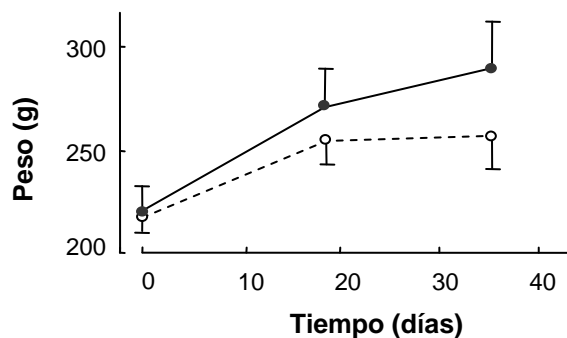


Fig. 17. Evolución del peso a lo largo del tratamiento crónico con dieta C (---o---) o AO (—●—), en la rata normal, medido tras ayuno de 18 horas (media \pm EEM, $n=8-9$ individuos).

Tabla 4. Glucosa, insulina y GLP-1 en plasma, e índice insulinogénico, en la rata normal saciada y alimentada con dieta C o AO durante 50 días.

| Día | Dieta | Glucosa (mM) | Insulina (pM) | GLP-1 (pM) | Índice insulinogénico (nmol/mol) |
|-----|-------|--------------------|---------------------|--------------|----------------------------------|
| 4 | C | $6,64 \pm 0,2$ (9) | 167 ± 17 (9) | $** \pm$ (2) | $25 \pm 2,6$ (9) |
| | AO | $6,74 \pm 0,2$ (8) | 214 ± 16 (8) | \pm (2) | $32 \pm 2,3$ (8) |
| 11 | C | $6,67 \pm 0,1$ (9) | 218 ± 19 (9) | \pm (2) | $33 \pm 2,6$ (9) |
| | AO | $6,56 \pm 0,1$ (8) | 201 ± 11 (8) | \pm (2) | $31 \pm 1,5$ (8) |
| 27 | C | $6,89 \pm 0,2$ (9) | 217 ± 17 (9) | \pm (2) | $32 \pm 2,6$ (9) |
| | AO | $6,87 \pm 0,1$ (8) | 223 ± 18 (8) | \pm (2) | $32 \pm 2,3$ (8) |
| 50 | C | $7,00 \pm 0,2$ (9) | 200 ± 12 (9) | \pm (2) | $29 \pm 2,1$ (9) |
| | AO | $6,61 \pm 0,1$ (8) | 233 ± 21 (8) *§ | \pm (2) | $23 \pm 1,7$ (8) *§ |

Media \pm EEM (número de individuos); $p<0,05$ vs * C, § día 4

caso se mantuvo hasta el día 36, en el que alcanzó un valor de $0,4 \pm 0,07 \mu\text{M}^2$ ($n=8$), menor ($p < 0,05$) que el inicial ($0,7 \pm 0,11 \mu\text{M}^2$), y también menor que el de C el día 36 ($0,5 \pm 0,09$, $n=9$) aunque, en este caso, la diferencia sólo fue significativa en el caso de las hembras ($p < 0,05$). La concentración de GLP-1 en plasma se mantuvo estable a lo largo del tratamiento ($108,9 \pm 3,5\%$ de C, $n=8$, $p < 0,05$).

Considerando las respuestas conjuntas al aceite de oliva, en tratamiento agudo o crónico (R, 1.3-1.5), y a pesar de que, en cualquier caso, las glucemias post-*prandium* no fueron llamativamente distintas, se podría afirmar que una dieta enriquecida con aceite de oliva favorece a la respuesta de insulina y GLP-1, así como al índice insulinogénico.

Tolerancia a glucosa intragástrica

Se sometió a los grupos C y AO a sobrecarga intragástrica de glucosa en ayunas, a los 19 o 36 días de tratamiento. El día 19 del tratamiento crónico, el peso del grupo AO (268 ± 20 g, $n=8$) fue mayor ($p < 0,05$) que el de C (256 ± 14 g, $n=9$), pero la glucemia basal en ayunas resultó ser similar en ambos (media global: $4,9 \pm 0,1$ mM, $n=17$).

En el grupo AO (**Fig. 18 y 19**), el incremento medio de glucosa en plasma tras la administración del azúcar fue, el día 19, $131 \pm 10\%$ ($n=40$), mayor ($p < 0,025$) que en el C ($100 \pm 9\%$, $n=45$); en cambio, el día 36, ese valor fue tan sólo $61 \pm 5\%$ ($n=24$, $p < 0,01$) de C durante los primeros 60 minutos, o de $76 \pm 5,8\%$ ($n=40$, $p < 0,07$) durante los 120 de la prueba. El porcentaje normalizado del grupo AO fue mucho menor ($p < 0,001$) el día 36 que el 19.

El incremento de la concentración de insulina fue, a lo largo de la prueba, siempre mayor ($p < 0,001$) en el grupo AO, con una media de $161 \pm 14\%$ de C, $n=40$; el día 36, también el valor medio del grupo AO fue mayor ($175 \pm 22\%$ de C, $n=40$, $p < 0,05$), diferencia especialmente notable en la primera media hora ($216 \pm 27\%$, $n=16$, $p < 0,02$).

El incremento medio del índice insulinogénico del grupo AO también fue mayor ($p < 0,05$) que el de C, tanto el día 19 ($133 \pm 14\%$, $n=40$, $p < 0,03$) como el 36 ($202 \pm 31\%$, $n=40$, $p < 0,025$), y también más alto ($p < 0,05$) el día 36 que el 19.

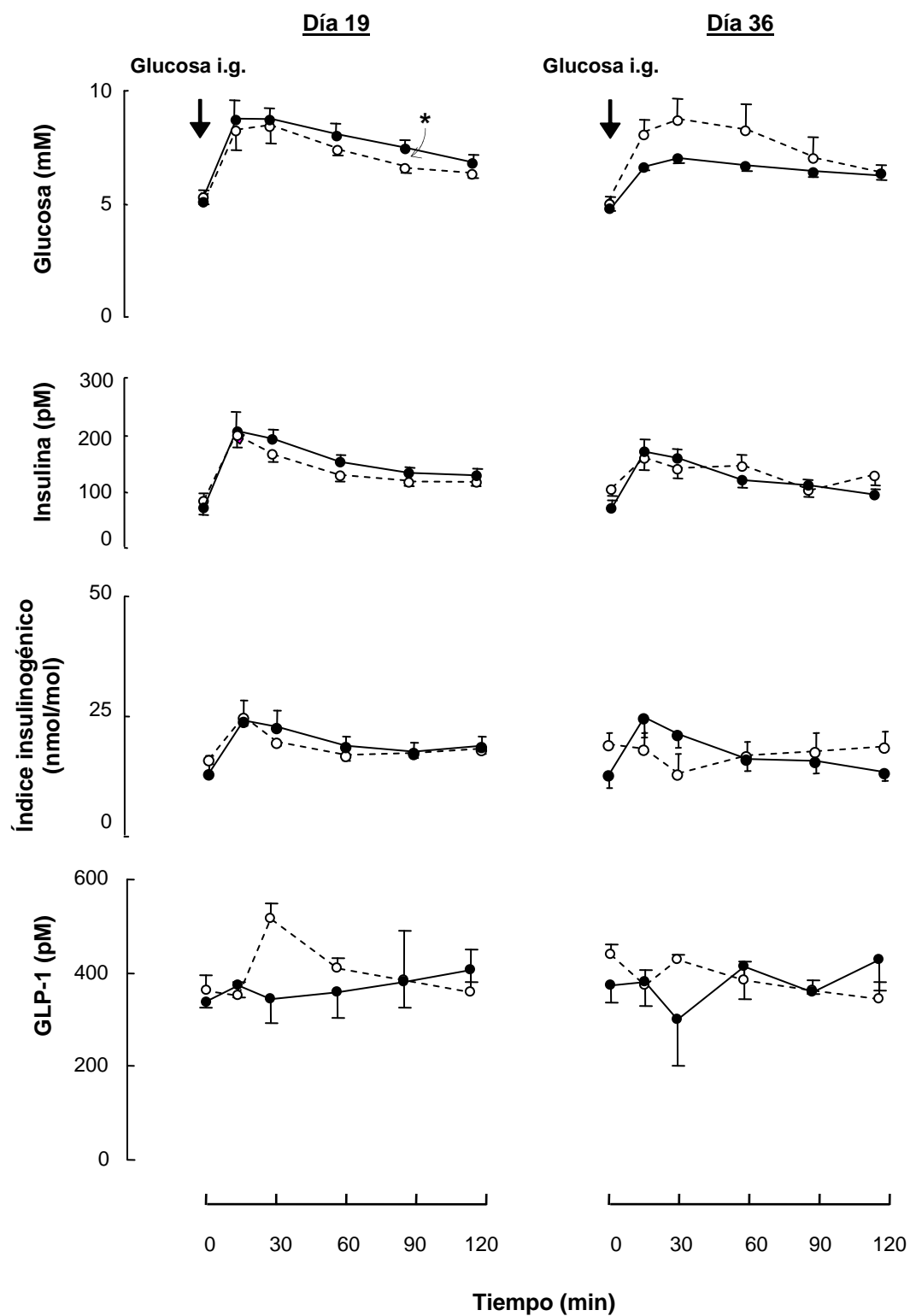


Fig. 18. Respuesta de la rata normal a glucosa intragástrica durante tratamiento crónico con dieta estándar, C (---○---) o estándar con aceite de oliva, AO (—●—). Media±EEM, n=8-9 individuos; *: $p < 0,05$ vs C.

La concentración basal de GLP-1 en el grupo AO (355 ± 18 pM, $n=4$) fue similar a la del C (402 ± 27 , $n=4$); pero mientras que el día 19 no pareció que el aceite afectara la respuesta de GLP-1, sí se observó un aumento el día 36, con un incremento pareado de 68 ± 6 pM ($n=10$, $p<0,005$), no detectado con la dieta control.

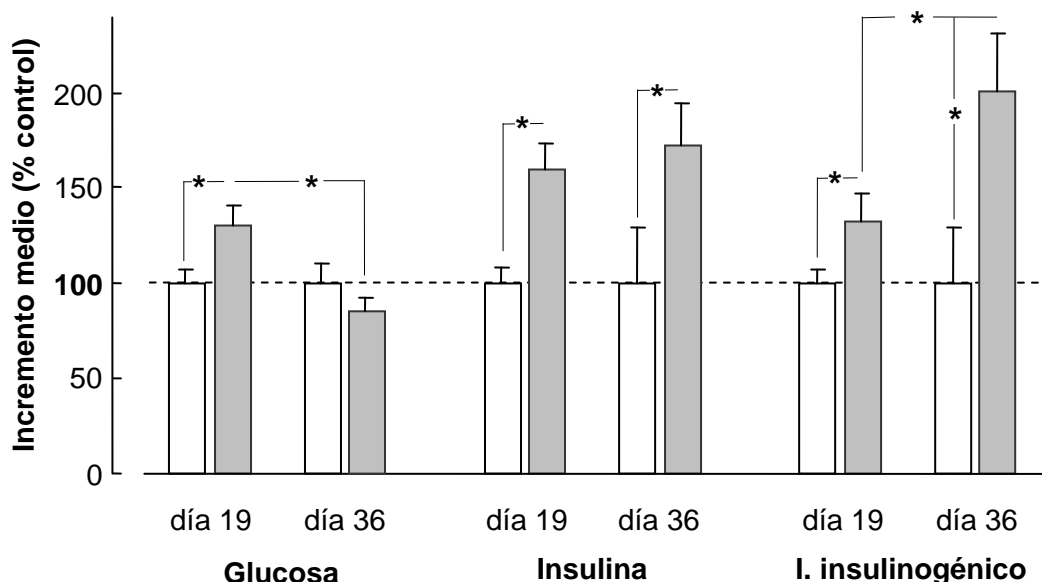


Fig. 19. Efecto del tratamiento crónico con AO (■), respecto a la dieta estándar control (□), sobre la respuesta a glucosa intragástrica, en la rata normal (media±EEM, $n=8-45$ individuos); *: $p<0,05$.

1.6. Respuesta inmediata a guar intragástrico

En esta parte del estudio se incluyeron tres grupos distintos de ratas, a los que se administró, respectivamente, glucosa (C), guar (G), o la combinación de glucosa+guar (C+G). El peso medio conjunto, en ayunas, de todos los animales ($n=24$) al inicio de la prueba fue 242 ± 5 g; la glucosa plasmática basal (**Fig. 20**) fue $4,6\pm 0,1$ mM, y la insulina, 669 ± 9 pM.

La administración intragástrica de glucosa indujo un claro aumento de la hexosa en plasma (**Fig. 20**), ya significativo en el minuto 15 y hasta el 120; sin embargo, en el grupo G, este aumento en la concentración sólo se detectó en los minutos 15 y 30, y el Δ área fue claramente menor ($p<0,001$) que con glucosa. La administración intragástrica conjunta de glucosa+guar no produjo modificación aparente, en la glucosa plasmática, en ningún momento a lo largo de la prueba.

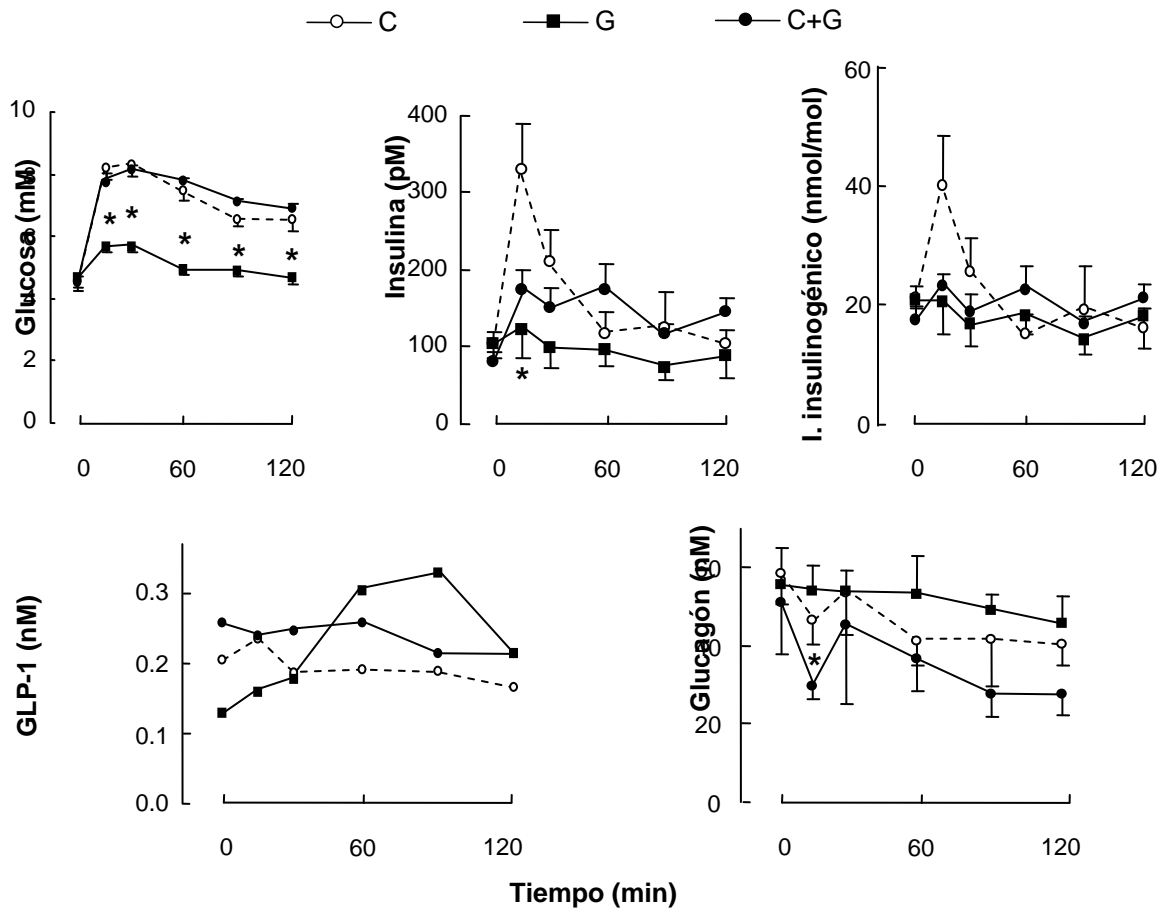


Fig. 20. Efecto, en la rata normal, de una sobrecarga intragástrica de glucosa (C), guar (G), y de la combinación de glucosa y guar (C+G), sobre la glucosa, insulina, glucagón y GLP-1 plasmáticos (media±EEM, n=2-8 ratas); *: $p < 0,05$ vs C.

Ese aumento en la glucosa plasmática, observado tras glucosa intragástrica, fue acompañado de un incremento de insulina (minuto 15: $p < 0,05$, n=4), que no se detectó, sin embargo, tras guar, ni tras glucosa+guar. Como era de esperar, la glucosa indujo un descenso claro de la concentración de glucagón plasmático (minuto 15: $p < 0,005$, n=20), no observada tras la administración intragástrica de guar, pero sí muy marcada, sobre todo en el minuto 15, tras glucosa+guar (minuto 15: $p < 0,005$, n=20).

En el caso del GLP-1, se detectó, tras glucosa intragástrica, un aumento aparente en el minuto 15, seguido de un descenso; sin embargo, el guar provocó un aumento progresivo del GLP-1 plasmático ya desde el minuto 15, que alcanzó el máximo entre los minutos 60 y 90 ($p < 0,05$, n=20).

1.7. Respuesta inmediata a la ingestión de pienso estándar + guar

En esta parte del estudio se incluyeron dos grupos de ratas, que tuvieron acceso libre pero limitado en el tiempo (15 minutos), a pienso estándar solo (grupo control, C) o combinado con 20% de goma de guar (G). El peso, y los valores basales de glucosa, insulina y GLP-1 plasmáticos iniciales, medidos en ayunas, fueron, respectivamente, 266 ± 8 g ($n=12$), $5,93 \pm 0,26$ mM ($n=12$), 166 ± 25 pM ($n=12$) y 220 ± 54 pM ($n=4$). En ningún caso hubo diferencia entre los grupos C y G.

La ingestión de G provocó un aumento de los valores de glucosa en plasma, ligeramente menor que el detectado en el grupo que ingirió C, alcanzando esta diferencia entre grupos significación estadística en los minutos 10 ($p < 0,025$) y 40 ($p < 0,05$) de la prueba (**Fig. 21**). La concentración basal de insulina no se vio alterada por ninguno de los dos tipos de dieta, pero sí se observó, no obstante, un aumento significativo del GLP-1 en el grupo C, en el minuto 10, que no se había registrado en G

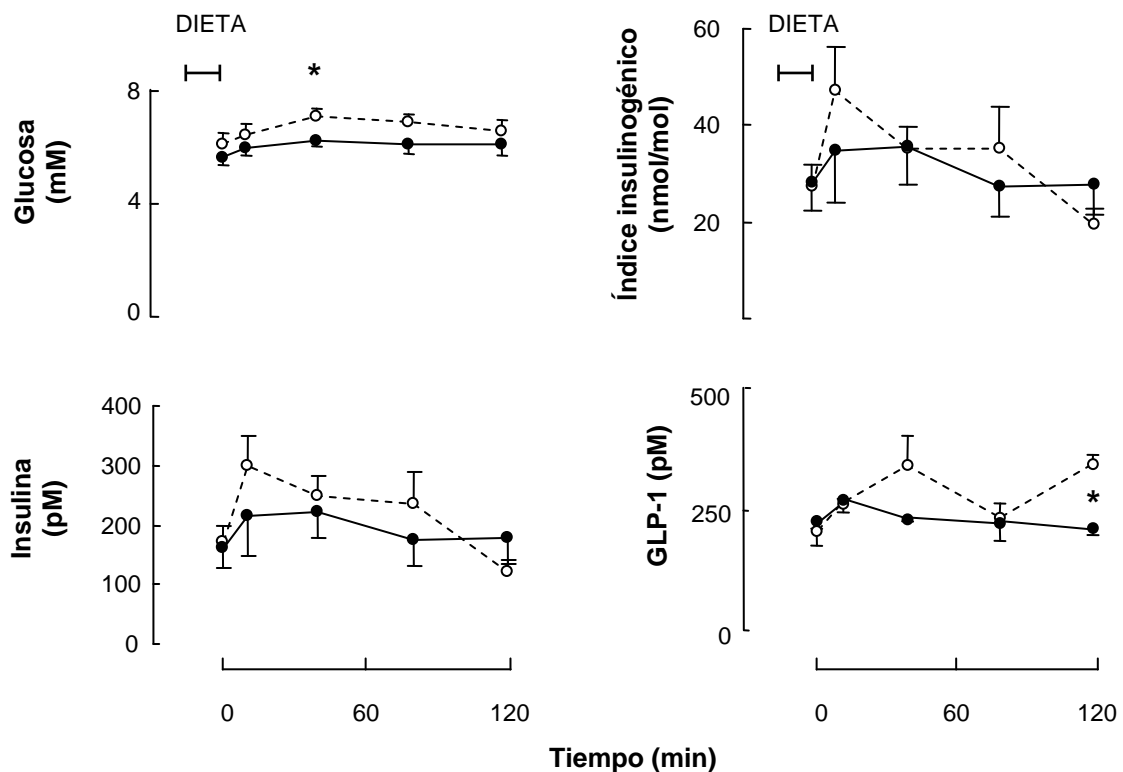


Fig. 21. Efecto inmediato, en la rata normal, de la dieta estándar, C (---○---) o estándar con guar, G (—●—), sobre la glucosa, insulina y GLP-1 plasmáticos, e índice insulínogénico (media \pm EEM, $n=6-8$ individuos); *: $p < 0,05$ vs C, §: $p < 0,05$ vs día 19.

(g.l.=14, $p<0,05$). La presencia de guar (G) inhibió completamente ($p<0,03$, $n=16$) la respuesta de GLP-1 (85 ± 24 pM incremento medio sobre el basal, $p<0,01$ $n=8$) observada en el grupo C.

1.8. Respuesta al tratamiento crónico con guar

En esta parte del estudio se incluyeron dos grupos de ratas, a los que se alimentó, durante 50 días (M&M 8), con pienso estándar solo (control, C) o combinado con 20% de guar (G). El incremento de peso tras los 50 días de alimentación crónica fue similar (**Fig. 22**) en ambos grupos (C: 123 ± 9 g, $n=6$; G: 115 ± 16 g, $n=6$). La concentración de glucosa en plasma en ayunas no sufrió cambios aparentes en ninguno de los dos

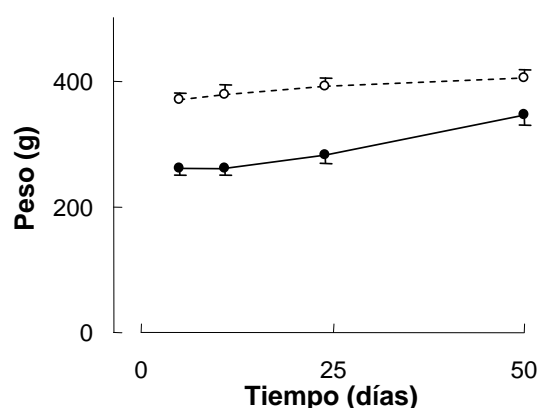


Fig. 22. Evolución del peso a lo largo del tratamiento crónico con dieta C (-o-) o G (-●-), en la rata normal (media±EEM, $n=6-8$ individuos).

grupos, C y G, pero, tanto en uno como en el otro, la insulina plasmática en ayunas fue

en aumento progresivo (C: 171 ± 29 pM el día 0 y 591 ± 191 pM el día 36, $n=6$; G: 161 ± 31 y 779 ± 107 pM el día 0 y 36, respectivamente, $n=6$). Este incremento, que resultó ser 18 ± 3 pM/día en G, fue mayor ($p<0,075$) que el de C (9 ± 3 pM/día). El HOMA basal de G relativo a C (**Fig. 23**) se incrementó ($p<0,05$, $n=10$) desde el $92\pm 18\%$ al inicio del tratamiento hasta el $137\pm 26\%$ 36 días después.

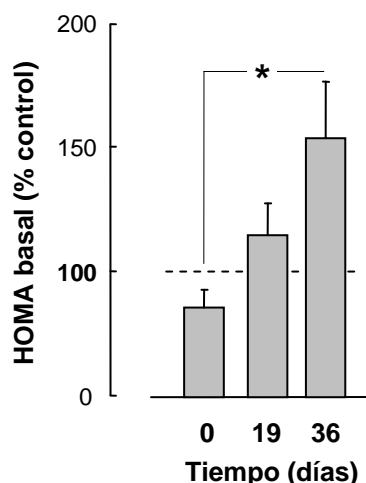


Fig. 23 HOMA basal de la rata alimentada crónicamente con dieta estándar con guar (G), respecto a la dieta control (C). Media±EEM, $n=12$ individuos; *: $p<0,05$ vs C.

Tolerancia a glucosa intragástrica

Se sometió a los grupos C y F a sobrecarga intragástrica de glucosa en ayunas, a los 19 o 36 días de tratamiento. Todos los parámetros estudiados fueron similares en ambos grupos

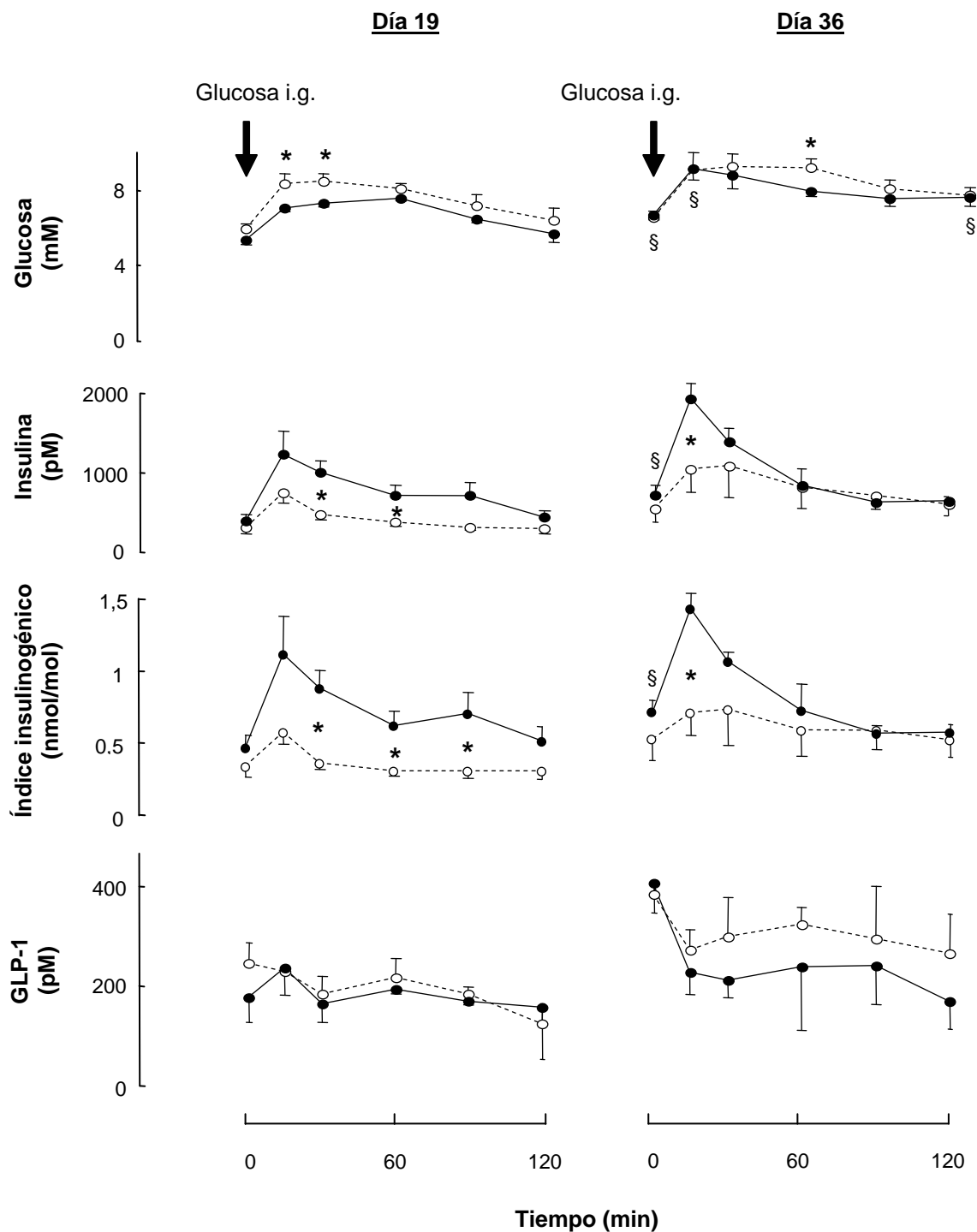


Fig. 24. Respuesta a glucosa intragástrica en la rata normal alimentada durante 19 o 36 días con dieta estándar, C (---○---) o estándar con guar, G (—●—). Media±EEM, n=6-8 ratas; *: $p < 0,05$ vs C, §: $p < 0,05$ vs día 19.

inmediatamente antes de la prueba.

Tras 19 días de alimentación con G, la tolerancia a glucosa intragástrica (**Fig. 24 y 25**) fue ligeramente mayor que la del grupo alimentado con pienso estándar (C), alcanzando esta diferencia significación estadística en los minutos 15 y 30 tras 19 días de tratamiento con G ($p<0,025$), y en el minuto 60 tras 36 días ($p<0,04$), con un valor medio de glucosa $92\pm 4\%$ del de C ($n=12$). La concentración basal de insulina fue similar entre grupos, aunque mayor ($p<0,03$) en la segunda prueba que en la primera (día 19: 388 ± 75 pM, $n=12$; día 36: 709 ± 115 pM, $n=12$); en las alimentadas con G, se

produjo un aumento mayor ($p<0,05$) de la respuesta de esta hormona.

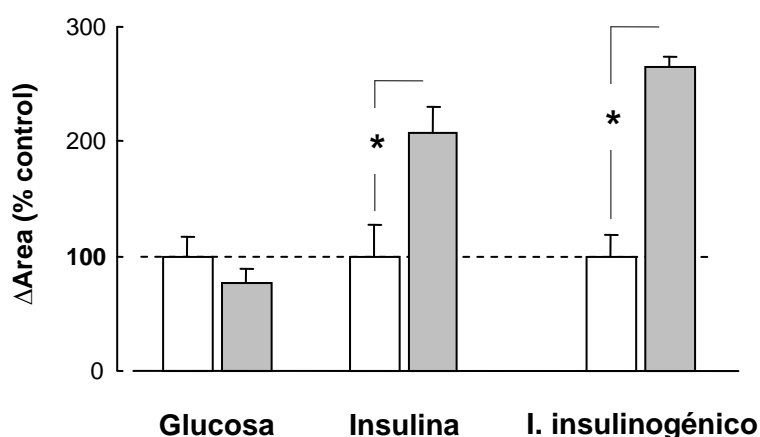


Fig. 25. Efecto, en la rata normal, del tratamiento crónico con dieta estándar combinada con guar, G (■), sobre la respuesta a glucosa intragástrica, relativo a la dieta estándar, C (□). Media \pm EEM, $n=12$ individuos; *: $p<0,05$ vs C.

El índice insulinogénico en el grupo de G, cuyo valor basal fue similar al de C en ambas pruebas, fue en todo momento mayor en G que en C, diferencia que resultó, tras 19 días de tratamiento, significativa ($p<0,04$ o menor) los minutos 30-90, y en el minuto 15, tras 36 días, con

un valor medio durante los 120 minutos también mayor ($p<0,05$ en las dos pruebas); el Δárea de G fue, el día 19, más del triple ($p<0,001$) de la de C, mientras que, 17 días después, esta diferencia se redujo al doble ($p<0,02$).

El GLP-1 basal no fue distinto en C y G. La administración intragástrica de glucosa no sólo no aumentó la respuesta de GLP-1, sino que la disminuyó ($p<0,01$) en ambos grupos, en magnitud similar, con un Δárea en el grupo G $101\pm 8\%$ de la de C ($n=4$).

1.9. Respuesta inmediata a la ingestión de pienso estándar + caseína

En esta parte del estudio se incluyeron dos grupos de ratas, que tuvieron acceso libre pero limitado en el tiempo (15 minutos), a pienso estándar solo (grupo control, C) o combinado con un 40% de caseína (CA). El peso de la rata no sufrió modificación durante el entrenamiento (M&M 5), en ningún caso; al finalizar éste, la media del peso del grupo C fue 262 ± 9 g ($n=6$), y 275 ± 11 g ($n=8$) en el caso del CA, valores no distintos entre sí. No se detectaron incrementos en el Δ área de glucosa plasmática tras CA (**Fig. 26**), mientras que en el grupo C ésta fue 112 ± 31 mM·min ($n=6$, $p < 0,01$). La insulina presentó el patrón opuesto, por lo que el índice insulinogénico resultante del grupo CA en el minuto 10 fue casi el doble ($p < 0,07$ vs C), y también mayor (45 ± 4 vs 33 ± 3 nmol/mol, $p < 0,009$, $n=30-40$) la media de los valores obtenidos a lo largo de la prueba.

La concentración media de GLP-1 fue similar en los dos grupos de ratas, con un valor neto conjunto de 263 ± 17 pM ($n=25$).

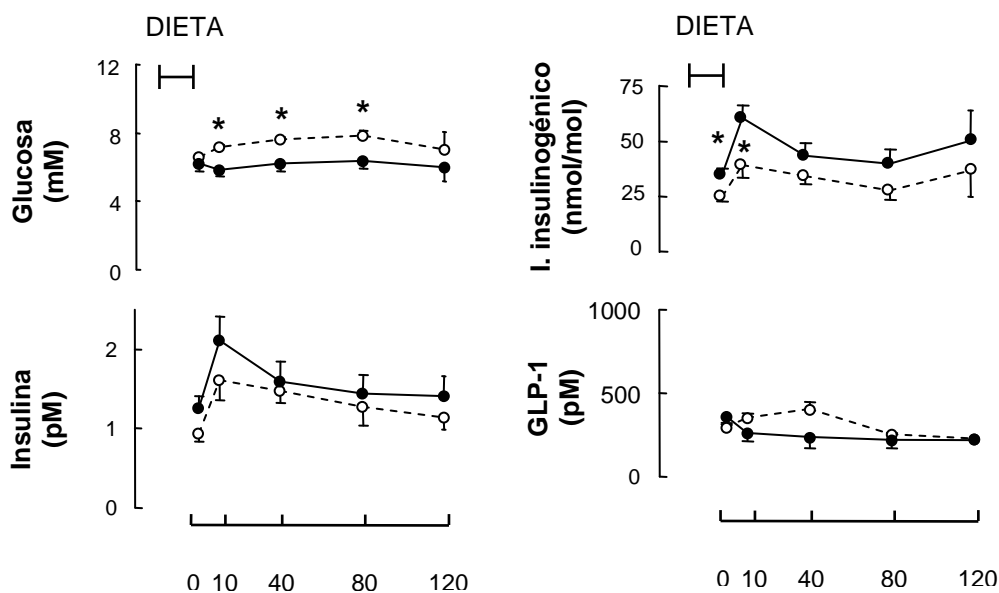


Fig. 26. Efecto inmediato de la dieta estándar C (---○---) o estándar con caseína, CA (—●—), sobre la glucosa, insulina y GLP-1 plasmáticos, e índice insulinogénico, en la rata normal (media±EEM, $n=2-8$ individuos); *: $p < 0,05$ vs C.

1.10. Respuesta al tratamiento crónico con caseína

En esta parte del estudio se incluyeron dos grupos de ratas, a los que se alimentó, durante 50 días (M&M 8), con pienso estándar solo (control, C) o combinado con 40% de caseína (CA). La ganancia de peso a lo largo del tratamiento fue similar en ambos grupos, C y CA (**Fig. 27**). Los valores de glucosa plasmática medidos en la rata saciada sufrieron un incremento a lo largo del tratamiento, también similar en los dos grupos; sin embargo, la glucosa medida tras ayuno nocturno (**Tabla 5 y Fig. 26**) fue mayor en CA los días 19 ($143\pm 7\%$, $p<0,001$) y 36 ($128\pm 7\%$, $p<0,03$). La insulina plasmática fue semejante en ambos grupos, excepto el día 19, con un valor en ayunas en CA de $174\pm 24\%$ de C, o de $75\pm 10\%$, en la rata

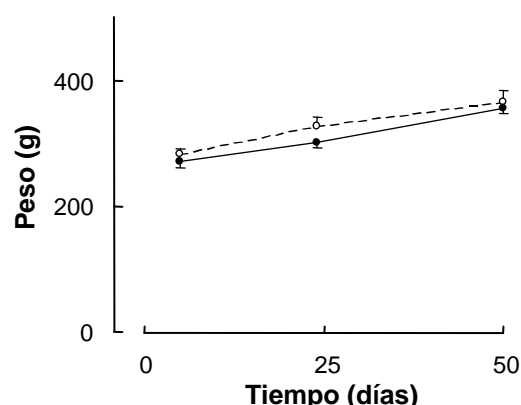


Fig. 27. Evolución del peso a lo largo del tratamiento crónico con dieta estándar (-○-) o caseína (-●-), en la rata normal (n=14 ratas)

Tabla 5. Glucosa, insulina y GLP-1 en plasma, índice insulinogénico y HOMA basal (en ayunas), en la rata normal en ayunas alimentada durante 50 días con dieta C o CA.

| Dieta | Día | Glucosa (mM) | Insulina (pM) | I. insulinogénico ^a | GLP-1 (pM) | Día | HOMA basal |
|-------|-----|---------------|---------------|--------------------------------|------------|-----|-----------------|
| C | 0 | 6,5±0,1 (6) | 161±18 (6) | 25±2,3 (6) | 282±35 (2) | 0 | 1,1±0,1 (6) |
| CA | | 6,2±0,5 (8) | 217±27 (8) | 33±2,6 (7) * | 383±82 (3) | | 1,4±0,3 (8) |
| C | 19 | 5,0±0,3 (6) | 98±19 (6) | 19±3,2 (6) | 205±83 (2) | 19 | 0,5±0,1 (6) |
| CA | | 7,1±0,4 (8) * | 170±23 (8) * | 23±2,6 (8) | 217±83 (2) | | 1,3 ± 0,2 (8) * |
| C | 36 | 5,4±0,4 (6) | 139±37 (6) | 24±5,4 (6) | 138±68 (2) | 36 | 0,8±0,2 (6) |
| CA | | 6,9±0,4 (8) * | 175±52 (8) | 31±4,6 (4) | 131±80 (2) | | 1,3±0,4 (8) |

^a: nmol insulina / mol glucosa. Media±EEM (n=número de individuos); *: $p<0,05$ vs C.

saciada ($p<0,05$, $n=6-8$). Ante este resultado, en apariencia contradictorio, estimamos más fiable la medida hecha en ayunas, por ser ésta más homogénea. El índice insulinogénico se mantuvo estable en los dos grupos a lo largo de todo el tratamiento, si bien es cierto que, en ayunas, el valor basal fue ligeramente mayor ($p<0,03$) en el grupo CA. El HOMA basal, inicialmente similar en los dos grupos, experimentó un descenso en C no observado en CA; el día 19, el valor del HOMA basal en CA fue

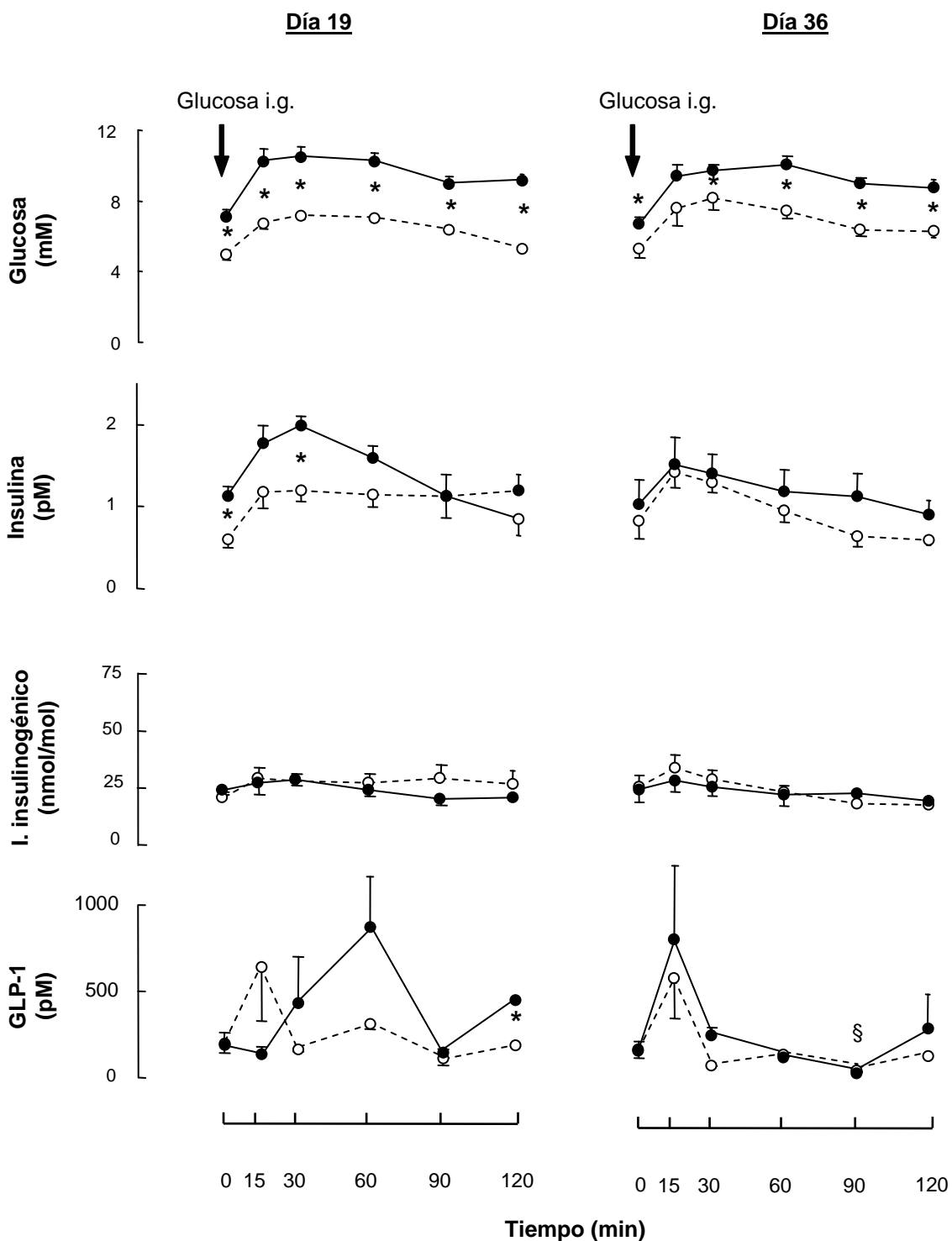


Fig. 28. Respuesta a glucosa intragástrica en la rata normal alimentada durante 19 o 36 días con dieta estándar, C (---○---) o estándar con caseína, CA (—●—). Media±EEM, n=2-8 individuos; *: $p < 0,05$ vs C. §: $p < 0,05$ vs día 19.

251±42% del de C ($p<0,01$); esta diferencia se atenuó el día 36, llegando a ser el 166±53% de C.

Tolerancia a glucosa intragástrica

Se sometió a los grupos C y CA a sobrecarga intragástrica de glucosa en ayunas, a los 19 o 36 días de tratamiento (**Fig. 28 y 29**). Los valores de glucosa, insulina, índice insulínico, HOMA *post-prandium* y GLP-1 obtenidos el día 19 fueron similares a los del día 36, por lo que aquí se presentan los resultados medios conjuntos.

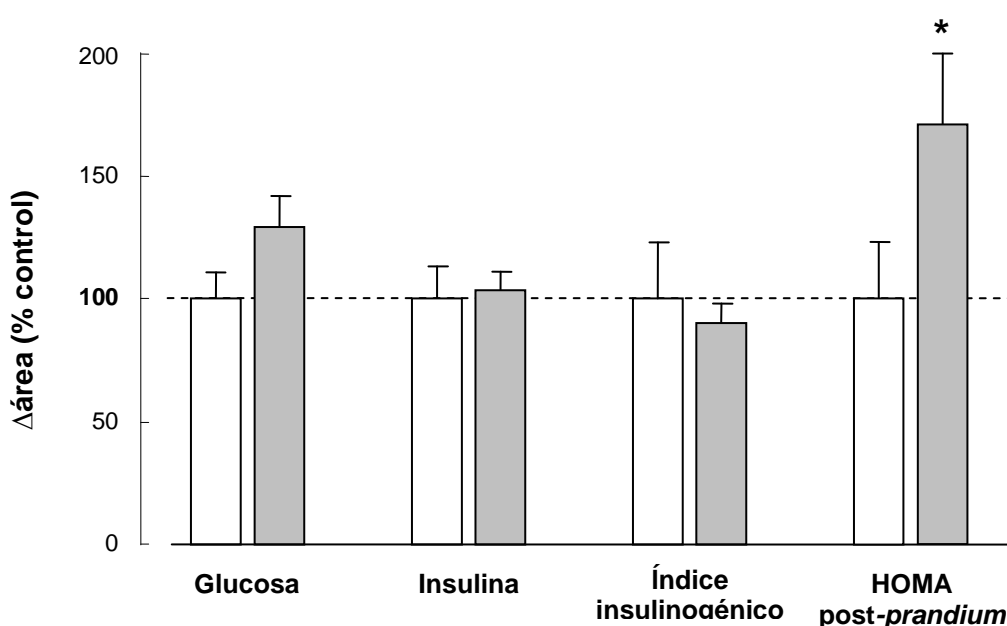


Fig. 29. Efecto del tratamiento crónico con dieta C (□) o CA (■), sobre la respuesta a glucosa intragástrica, en la rata normal (media±EEM, n=12-15 ratas); *: $p<0,05$ vs C.

La glucosa e insulina plasmáticas basales en el grupo CA fueron, respectivamente, 7,0±0,3 mM (n=16) y 174±27 pM (n=15), más altos ($p<0,01$) que los de C (5,19±0,27 y 114±20 pM, respectivamente, n=12). La concentración media durante la prueba también fue mayor ($p<0,03$) en el caso de CA (glucosa: 9,6±0,2 mM, n=16 vs C: 6,9±0,2, n=12; insulina: 215±24 pM, n=15 vs 159±12, n=12). La presencia de caseína en la dieta no afectó al índice insulínico, que fue similar en ambos grupos, pero sí incrementó sensiblemente el HOMA *post-prandium* hasta 165±34% del de C (n=14). No se detectaron diferencias en cuanto al GLP-1 plasmático, ni en su concentración basal ni en el Δ área durante los 120 minutos.

2. RATA DIABETICA TIPO 2

Se analizó el efecto del aceite de oliva, ingerido en combinación con la dieta, de forma aguda o crónica, sobre el peso, cantidad de alimento ingerido, tolerancia a la glucosa, secreción de insulina y GLP-1, contenido pancreático de insulina (R, 4) y el intestinal de GLP-1 (R, 5).

2.1. Respuesta inmediata a la ingestión de pienso estándar + aceite de oliva

En esta parte del estudio se incluyeron dos grupos de ratas, subdivididos en machos y hembras, que tuvieron acceso libre pero limitado en el tiempo (15 minutos), a pienso estándar solo (grupo control, C) o combinado con 6,5% de aceite de oliva (AO).

El peso de la rata, que inicialmente fue 315 ± 19 g ($n=12$) en C y 308 ± 24 g ($n=12$) en AO, valores no distintos entre sí, se mantuvo estable en ambos grupos durante los 7 días del entrenamiento (M&M, 7). En el grupo AO, la cantidad de pienso ingerido en 15

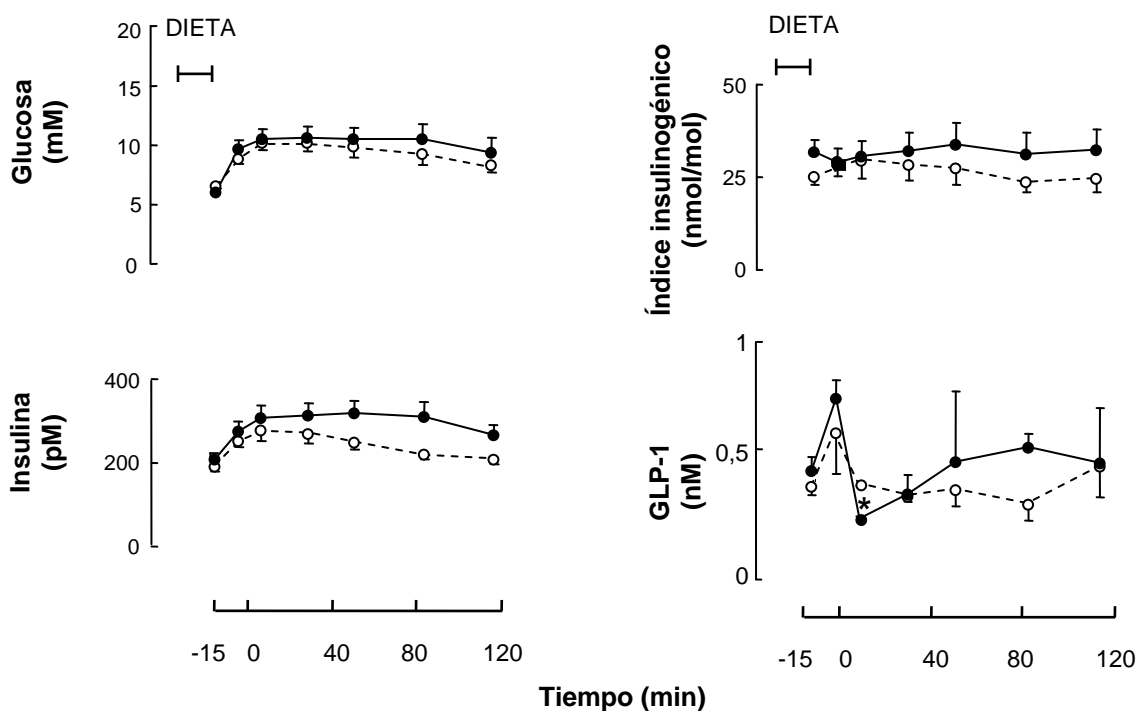


Fig. 30. Efecto inmediato, en la rata diabética tipo 2, de la dieta C (---○---) o AO (—●—) sobre la glucosa, insulina y GLP-1 plasmáticos, e índice insulinogénico (media±EEM, $n=2-8$ individuos).

minutos ($3,2\pm 0,0$ g/rata, $n=12$) fue mayor ($p<0,02$) que en el C ($2,4\pm 0,2$ g/rata, $n=12$). Los valores plasmáticos de glucosa e insulina iniciales fueron similares en ambos grupos. La presencia de aceite en la dieta no produjo valores de glucosa distintos (**Fig. 30**) de los detectados tras la dieta control (C), pero sí un incremento ($p<0,001$) en el minuto 120 respecto al valor basal, de $1,7\pm 0,7$ mM en C y $3,3\pm 1,1$ mM en AO ($n=12,$). En el grupo AO, la concentración media de insulina fue ligeramente más alta que en C, alcanzando significación estadística ($p<0,05$) a los 90 y 120 minutos; la media del índice insulinogénico fue $116\pm 6\%$ de C ($n=82$, $p<0,03$), y esta diferencia entre ambos, al igual que en el caso de la insulina plasmática, fue más pronunciada en los minutos finales de la prueba. Es curioso que en los machos diabéticos, tanto del grupo C como del AO, el Δ área del índice insulinogénico fuera negativa, mientras que en las hembras resultó positiva.

El HOMA basal fue similar en los cuatro grupos, pero el post-*prandium* (**Fig. 31**) tras 15 minutos de exposición a la dieta AO, fue mucho mayor ($p<0,03$) que tras la dieta C. Esta diferencia fue especialmente notable en el caso del macho, que alcanzó el

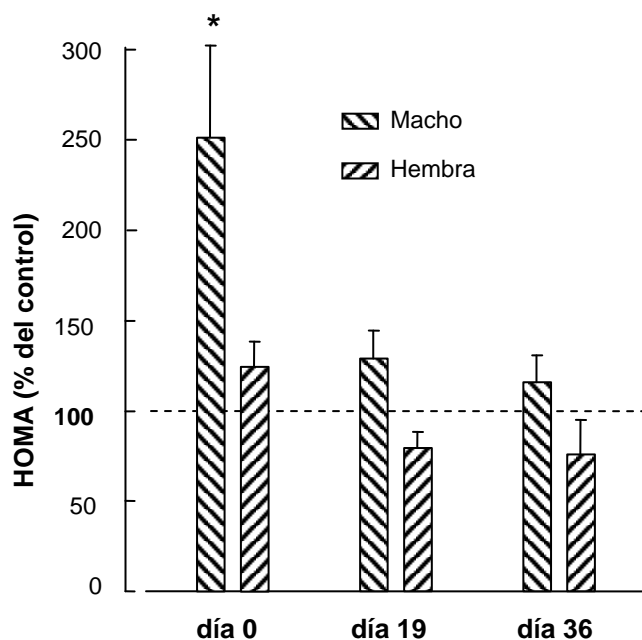


Fig. 31. HOMA post-*prandium* —día 0 tras ingestión aguda; días 19 y 36 de alimentación con AO, tras glucosa intragástrica—, en la rata diabética, con respecto a la dieta estándar C (media \pm EEM, $n=12$ individuos); *: $p<0,04$.

251 \pm 55% del valor en C, mientras que en la hembra sólo resultó el 120 \pm 22% de C ($n=6$, en todos los casos).

La concentración plasmática basal de GLP-1 en C y AO fue 397 ± 39 y 461 ± 55 pM ($n=2$), respectivamente, valores indistintos entre sí. El perfil de secreción de GLP-1 tras la ingestión aguda de AO proporcionó un Δ área de 21 ± 1 nM·min, mayor que tras la dieta C, con la cual el Δ área fue nula, aunque la diferencia no llegó a alcanzar significación estadística,

quizás por el reducido tamaño de la muestra.

2.2. Respuesta a la ingestión crónica de aceite de oliva

En esta parte del estudio se incluyeron dos grupos de ratas, subdivididos en machos y hembras, a los que se alimentó, durante 50 días (M&M 8), con pienso estándar (control, C) o combinado con 6,5% de aceite de oliva (AO). En el grupo alimentado con AO durante 50 días, el aumento de peso a lo largo del tratamiento (**Fig. 32**) fue tan sólo el $55\pm 10\%$ ($p < 0,05$, $n=10$) del observado con dieta C.

En el grupo AO, respecto al C, si bien los valores de glucosa plasmática (**Tabla 6**) tendieron a ser mayores, la insulina, sin embargo, resultó similar; tampoco se observaron diferencias en el índice insulinogénico; no obstante, al separar los animales por sexos, se observó que el de los machos AO siempre era más alto que el de los C, y el de las hembras, más bajo;

esta diferencia alcanzó significación estadística ($p < 0,02$) en los machos los días 4 y 11.

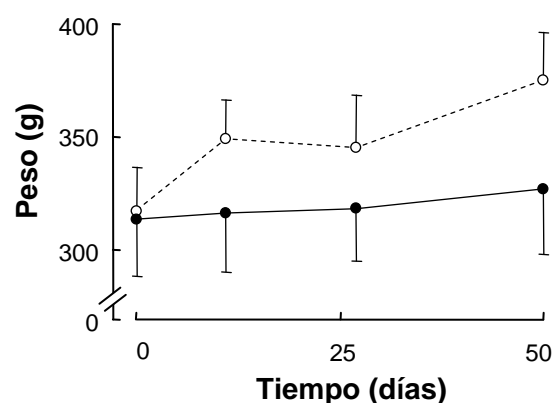


Fig. 32. Evolución del peso a lo largo del tratamiento crónico con dieta estándar (---○---) o estándar con aceite de oliva, AO (—●—), en la rata diabética tipo 2 (media±EEM, $n=10$ individuos).

Tabla 6. Glucosa, insulina y GLP-1 en plasma, índice insulinogénico y HOMA basal, en la rata diabética tipo 2 en ayunas alimentada durante 50 días con dieta C o AO.

| Día | Dieta | Glucosa (mM) | Insulina (pM) | I. insulinog. (nmol/mol) | HOMA basal | GLP-1 (pM) |
|-----|-------|--------------|---------------|--------------------------|--------------|------------|
| 0 | C | 6,7±0,2 (12) | 161±13 (12) | 24±2 (12) | 1,1±0,1 (12) | 397±39 (2) |
| | AO | 6,1±0,3 (12) | 182±17 (12) | 30±3 (12) | 1,1±0,1 (12) | 461±55 (2) |
| 19 | C | 4,3±0,2 (12) | 164±20 (12) | 40±5 (12) | 0,7±0,1 (12) | 137±25 (2) |
| | AO | 4,4±0,2 (12) | 177±15 (12) | 41±4 (12) | 0,8±0,1 (12) | 154±23 (2) |
| 36 | C | 4,4±0,2 (12) | 166±27 (12) | 37±6 (12) | 0,8±0,1 (12) | 181±3 (2) |
| | AO | 4,3±0,1 (11) | 143±17 (11) | 37±3 (11) | 0,6±0,1 (11) | 191±62 (2) |

Media±EEM (número de individuos).

Al inicio del tratamiento (día 0), el HOMA post-*prandium* fue un $251\pm 55\%$ del de C en los machos, pero sólo un $120\pm 22\%$ de C en las hembras.

La presencia de aceite en la dieta no afectó al valor basal de GLP-1 en relación al del grupo C.

Tolerancia a glucosa intragástrica

Se sometió a los grupos C y AO a una sobrecarga intragástrica de glucosa en ayunas (**Fig. 33 y 34**), a los 19 o 36 días de tratamiento. Tanto la rata del grupo AO como la del C, justo antes de serle administrada la glucosa intragástrica el día 19 y 36, pesaba menos que lo teórico calculado por extrapolación lineal para la rata saciada el día 11, 27 y 50 ($5\pm 1\%$, $n=46$, $p<0,001$). No obstante, el peso del grupo AO el día 19 (268 ± 20 g, $n=8$) fue mayor ($p<0,05$) que el del C (256 ± 14 g, $n=9$).

En el grupo AO, tras la sobrecarga intragástrica de glucosa del día 19, la concentración de la hexosa en plasma fue, en todo momento (**Fig. 33**), mayor ($p<0,005$) que en C, con una media de $122\pm 6\%$ ($n=72$) de C (**Fig. 34**); sin embargo, no se pudo detectar tal diferencia el día 36 ($103\pm 5\%$, $n=65$). En ningún caso se recuperó la concentración de glucosa basal, ni siquiera en el minuto 120. Sí hubo, sin embargo, una modificación en la homeostasis de la glucosa, en función del género, de forma que el macho AO presentó una media de $161\pm 8\%$ de C ($n=36$) el día 19, y de $127\pm 6\%$ ($n=29$) el día 36, más alta ($p<0,001$) que la de la hembra, en la cual, los valores fueron $79\pm 4\%$ ($n=36$) el día 19 y $85\pm 7\%$ de C ($n=36$) el 36 ($p<0,05$ vs C, en todos los casos).

El valor de insulina plasmática basal de la rata diabética en ayuno fue menor ($p<0,001$, $n=47$) que en la rata saciada. La administración intragástrica de glucosa provocó un aumento en la concentración de insulina, con un máximo entre los minutos 15-30. Los días 19 y 36, la concentración media de insulina representó, respectivamente, tan sólo el $75\pm 6\%$ y $62\pm 7\%$ de los correspondientes valores en estado saciado ($n=24$, $p<0,001$). No se observaron diferencias significativas entre el grupo AO y el C, en ninguno de los dos días.

El índice insulinogénico basal del grupo AO fue similar al del C, tanto el día 19 como el 36. La administración intragástrica de glucosa resultó, invariablemente, en un paradójico descenso del índice insulinogénico (**Fig. 34**), hasta un $63\pm 4\%$ del valor basal en el minuto 60 ($n=47$, $p<0,001$), que contrasta con lo observado en la rata normal (**Fig. 18**). La diferencia entre el índice insulinogénico medio de la rata C y la AO sólo alcanzó

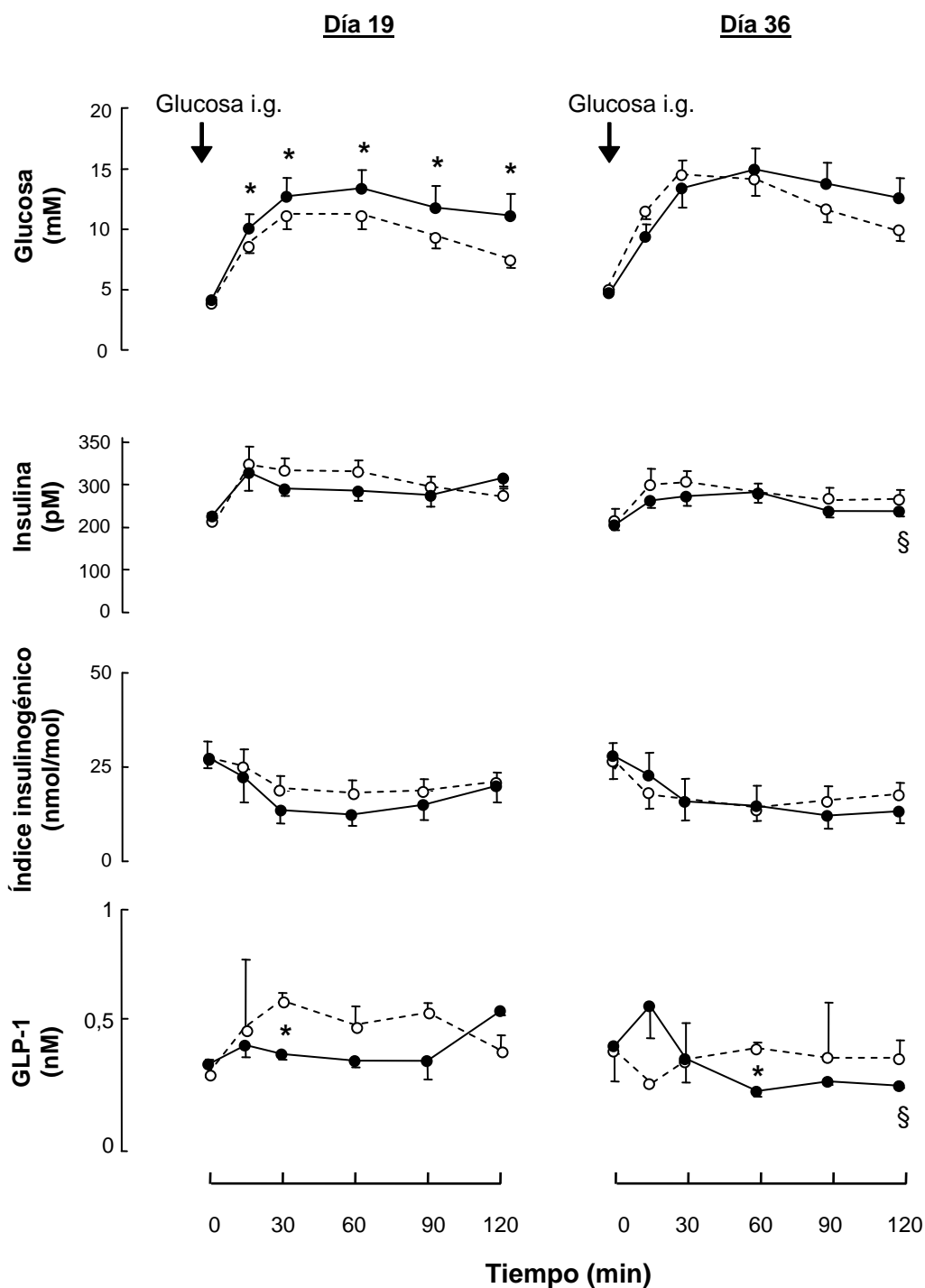


Fig. 33. Respuesta a glucosa intragástrica en la rata diabética tipo 2 sometida a alimentación crónica con dieta estándar, C (---○---) o estándar con aceite de oliva, AO (—●—). Media±EEM, n=2-8 individuos; *: $p < 0,05$ vs C; §: $p < 0,05$ vs día 19.

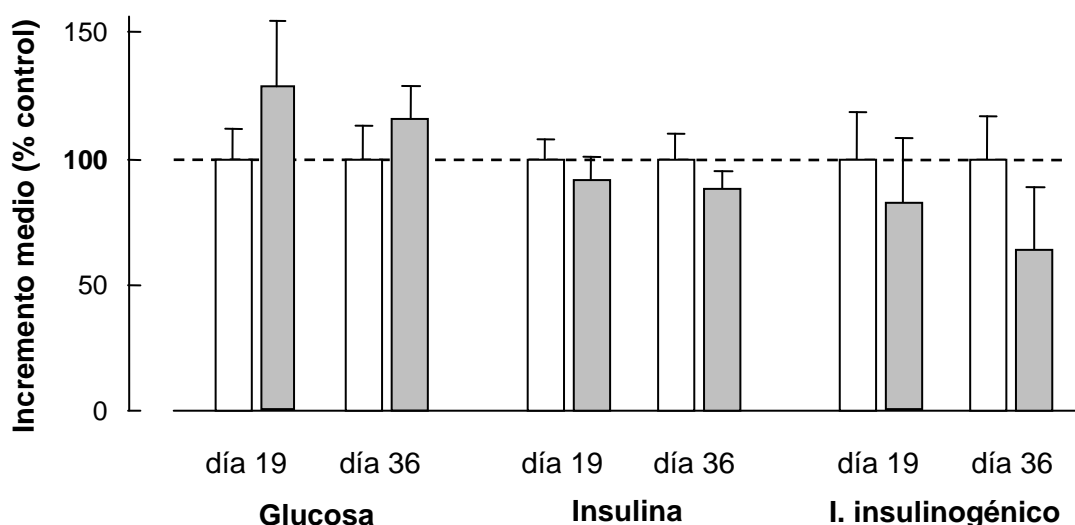


Fig. 34. Efecto del tratamiento crónico con dieta estándar (□) o MUFA (■), sobre la respuesta a glucosa intragástrica, en la rata diabética tipo 2 (media±EEM, n=8–45 ratas).

significación estadística ($p < 0,01$) el día 19, y eso sólo en el caso de los machos, con un valor de $74 \pm 12\%$ del basal, en el grupo C, y de un $33 \pm 4\%$ en el AO (ambos grupos, $n=6$).

En cuanto al HOMA basal, no hubo diferencias entre grupos en ninguna de las dos pruebas; en ambas, el valor HOMA post-prandium de AO, relativo a C (**Fig. 31**), tendió a ser mayor en los machos que en las hembras ($p < 0,02$ el día 19), aunque en ningún caso hubo diferencia significativa entre los grupos C y AO.

La administración de glucosa incrementó ($p < 0,025$) el GLP-1 plasmático del grupo AO en una media de $17 \pm 1\%$ sobre la basal ($n=40$), con un máximo entre los minutos 15-30, tendiendo a presentar valores menores que los del grupo C; el Δ área de GLP-1 de AO fue tan sólo el $42 \pm 7\%$ de la de C ($p < 0,02$, $n=4$), aunque mostró una cierta recuperación el día 36 respecto al 19.

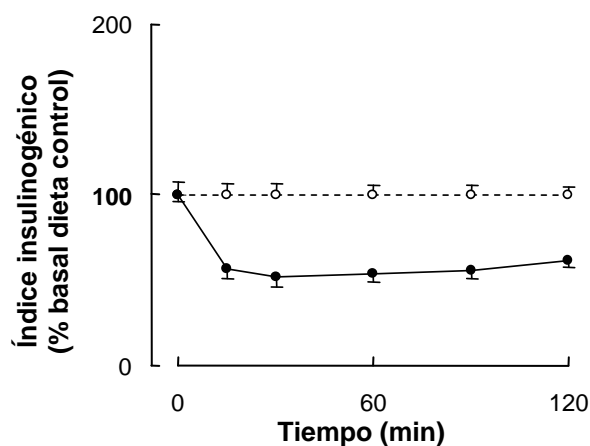


Fig. 35. Índice insulínogénico durante una sobrecarga intragástrica de glucosa (día 19 y 36), en la rata diabética alimentada con dieta C ---○--- o M —●— (media±EEM, n=12 individuos).

3. RATA RESISTENTE A INSULINA

Se generó el modelo por alimentación, durante 65 días, con una dieta rica en fructosa (M&M, 3) a la rata normal; en este modelo se analizó la respuesta a la ingestión crónica de dieta estándar, y de ésta combinada con aceite de oliva o goma de guar.

3.1. Validación del modelo de resistencia a insulina inducido por fructosa

Se determinó la demanda de glucosa intravenosa en la rata normal alimentada con dieta estándar (control, C), y en aquellas a las que se proporcionó la misma dieta estándar y agua suplementada con fructosa al 20% (grupo F).

Al inicio del tratamiento, el peso de todos los animales fue similar, con un valor medio conjunto de 229 ± 8 g ($n=22$). Durante el tratamiento, el pienso ingerido por el grupo F fue el $65,2 \pm 3,1\%$ del de C; sin embargo, este grupo recibió, a través de la bebida, $15,5 \pm 0,7$ ml de fructosa, por lo que la cantidad total de calorías resultó ser un $30 \pm 0,8\%$ más ($p < 0,001$) que la del grupo C. A pesar de este mayor aporte calórico, la ganancia de peso del grupo F fue $1,8 \pm 0,1$ g/día, que resultó ser un $14,3 \pm 1,3\%$ menos ($p < 0,004$) que el de C ($n=9-13$). La presencia de fructosa en el agua (**Fig. 36**) durante 65 días produjo un aumento en la glucosa plasmática de $13,7 \pm 2,7$ $\mu\text{M}/\text{día}$ ($p < 0,002$ vs basal), y un ligero incremento de la insulina, lo que se tradujo en un aumento ($p < 0,02$) del HOMA basal, con un valor final de $156 \pm 19\%$ del observado al principio del tratamiento ($n=13$); el índice insulinogénico, sin embargo, permaneció relativamente estable. Los valores de los cuatro parámetros mencionados fueron mayores ($p < 0,04$ o menor) en el grupo F que en el C, el cual no sufrió alteración de ninguno de ellos durante el tratamiento. La concentración plasmática de GLP-1 también se incrementó con fructosa ($p < 0,05$).

Demanda de glucosa intravenosa

Tanto el peso como los valores basales de glucosa e insulina en plasma, índice insulinogénico y HOMA fueron iguales en los grupos C y F en el momento de la prueba (M&M, 3) realizada al término de los 65 días de tratamiento.

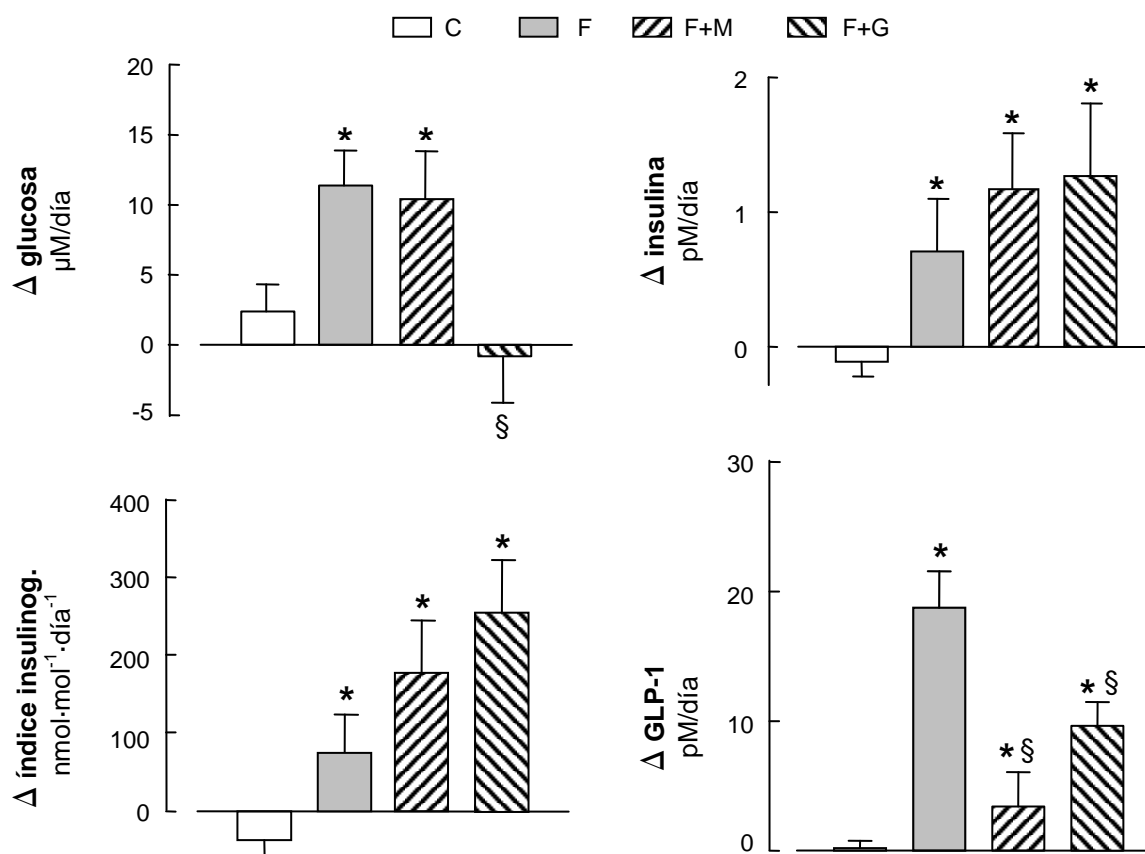


Fig. 36. Efecto de la incorporación de aceite de oliva (FO) o guar (FG) en la alimentación, sobre el estado de resistencia a insulina inducido por una dieta con fructosa (F), respecto al pienso estándar control (C). Media±EEM, n=8-13 individuos; *: $p < 0,05$ vs C, §: $p < 0,05$ vs F.

La glucosa plasmática de F aumentó durante el clamp (**Fig. 37**), pero se mantuvo siempre dentro del rango normoglucémico; la insulina permaneció en todo momento muy por encima del valor basal, y el índice insulínico y HOMA también sufrieron un importante y progresivo incremento; sin embargo, en ningún caso se detectaron diferencias significativas entre C y F. La concentración plasmática de GLP-1 antes de la prueba también fue similar en ambos grupos, pero mientras que en C no aumentó significativamente durante la prueba, sí lo hizo en F, con un incremento sobre la basal ($p < 0,003$) de 1320 ± 423 pM.

En el grupo F, la cantidad de glucosa intravenosa necesaria para el mantenimiento de la glucemia basal (**Fig. 38**) fue $5,63 \pm 0,37$ $\text{mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$, que resultó lógicamente menor ($p < 0,02$, $n=9$) que en el grupo C, el cual demandó $6,92 \pm 0,29$ $\text{mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ($n=13$). Estos resultados sirvieron para la selección de aquellos animales válidos como modelo de resistencia a insulina.

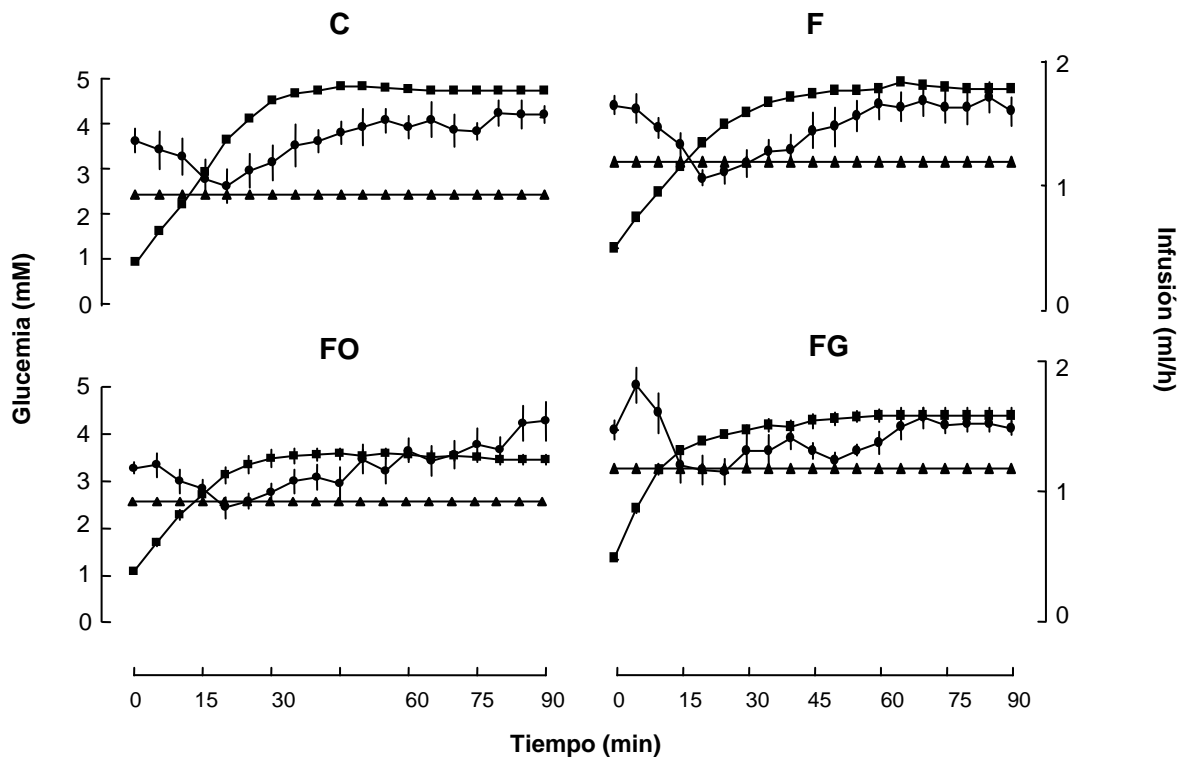


Fig. 37. Prueba de demanda de glucosa intravenosa en ratas control (C) y resistentes a insulina por fructosa (F): —▲— insulina infundida (ml/h); —■— glucosa requerida (ml/h); —●— Glucemia (mM). Media±EEM, n=8-13 individuos.

3.2. Efecto del aceite de oliva sobre la resistencia a insulina y la secreción hormonal

Se analizó la demanda de glucosa intravenosa en animales, inicialmente normales, a los que se indujo una resistencia a insulina por alimentación crónica (65 días) con dieta estándar + fructosa (grupo F), y su diferencia con un grupo al que se administró la misma dieta estándar combinada con fructosa, pero esta vez suplementada con un 15% de aceite de oliva (grupo FO).

Los valores basales iniciales de glucosa e insulina en plasma, índice insulinogénico y HOMA no fueron distintos entre ambos grupos. Durante el tratamiento, la cantidad de alimento ingerido por el grupo FO fue mayor, sin diferencia en el volumen de disolución fructosa; además, el pienso para el grupo FO tenía un mayor contenido calórico, por lo que el aporte energético en FO fue un $51\pm 3\%$ mayor que en F ($p < 0,001$, $n=8$).

Respecto a F, el tratamiento con FO indujo una mayor ganancia de peso ($p<0,04$, $n=12$), mientras que el incremento de glucosa e insulina en plasma, índice insulinogénico y HOMA basal fueron similares en ambos grupos. A diferencia de F (R, 3.1), la concentración plasmática de GLP-1 en FO no sufrió cambios ($p<0,02$ vs F).

Demanda de glucosa intravenosa

Tanto el peso como los valores plasmáticos de glucosa e insulina, índice insulinogénico y HOMA basal fueron similares en los grupos F y FO a la hora de la prueba (día 65). Durante el clamp, la concentración de insulina en FO fue en todo momento más del 140% de la de F ($p<0,05$ o menor), con un valor en el minuto 90 que resultó ser más del doble que en F ($8,7\pm 1,3$ vs $4,7\pm 0,5$ nM, $p<0,02$, $n=10$), y con un incremento sobre el valor basal del $191\pm 16\%$ de C ($p<0,02$); lo mismo sucedió con el índice insulinogénico y el HOMA, con incrementos respectivos de $166\pm 9\%$ de C, $p<0,002$, y $225\pm 23\%$ de C, $p<0,05$ ($n=10$). El incremento de GLP-1 fue similar en FO y F, con una media conjunta de 1122 ± 530 pM ($n=10$), pero en el caso de FO no fue significativo.

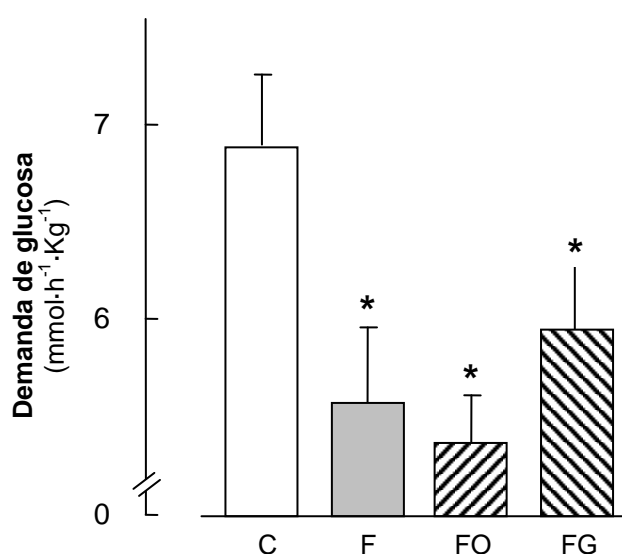


Fig. 38. Demanda de glucosa intravenosa durante condiciones de hiperinsulinemia, en la rata sometida a tratamiento crónico con dieta C (control), F, FO o FG (media±EEM, $n=8-13$ individuos); *: $p<0,05$ vs C.

La cantidad de glucosa intravenosa necesaria para mantener la glucemia basal en FO fue $5,39\pm 0,24$ mmol·h⁻¹·Kg⁻¹, valor similar al de F.

3.3. Efecto del guar sobre la resistencia a insulina y la secreción hormonal

Se analizó la demanda de glucosa intravenosa en animales, inicialmente normales, a los que se indujo una resistencia a insulina por alimentación crónica (65 días) con dieta estándar + fructosa (grupo F), y su diferencia con un grupo al que se administró la

misma dieta estándar combinada con fructosa, pero esta vez suplementada con un 20% de goma de guar (grupo FG).

Respecto a F, los animales FG ingirieron una menor cantidad del preparado de pienso ($p<0,04$), que compensaron con un incremento del 27% en la demanda de disolución de fructosa ($p<0,002$), con lo que el aporte calórico medio fue similar en ambos grupos. Si bien el peso de la rata destinada a formar el grupo F era inicialmente mayor que el de la FG, no se observó diferencia en el incremento total del peso al finalizar los tratamientos respectivos. La concentración de glucosa en plasma del grupo FG (**Fig. 36**), que en un principio era $5,6\pm 0,2$ mM, mayor ($p<0,001$, $n=8-13$) que la de F ($4,6\pm 0,1$ mM), no sufrió cambios a lo largo del tratamiento, igualándose ambos al final de éste. El valor de insulina en plasma, que inicialmente era 130 ± 7 pM en F, y 114 ± 21 en FG, valores similares entre sí, experimentó un incremento tras el tratamiento F ($p<0,04$) o FG ($p<0,02$), siendo éste, no obstante, aparentemente mayor en FG. Sin embargo, estas modificaciones en la insulina plasmática se reflejaron en un incremento ($p<0,02$) del índice insulinogénico sólo tras el tratamiento con FG, con valores de 20 ± 4 nmol/mol antes del tratamiento, y 37 ± 4 tras éste ($n=8$), lo que supuso un aumento de 17 ± 4 nmol/mol ($n=6$). El HOMA de FG también se vio incrementado ($p<0,03$) desde $0,6\pm 0,1$ ($n=8$) hasta $1,1\pm 0,1$ μM^2 , incremento comparable al detectado en F. El GLP-1 plasmático, que en FG fue inicialmente ($4,1\pm 0,3$ nM, $n=4$) mayor ($p<0,001$), se equiparó al valor de F tras los 65 días con guar (14 ± 2 nM, media de ambos, $n=11$).

El grupo FG, a diferencia con el FO (R, 3.2), ganó menos peso ($p<0,02$), y no sufrió cambios en la concentración plasmática de glucosa. El incremento del índice insulinogénico fue algo mayor, aunque no significativamente, con guar que con aceite, mientras que el incremento en el HOMA basal fue comparable en ambos grupos. A diferencia de lo observado en el grupo FO, el GLP-1 plasmático en FG no se modificó tras los 65 días de tratamiento.

Demanda de glucosa intravenosa

Los niveles de glucosa, insulina, índice insulinogénico y HOMA basales del grupo FG fueron equivalentes a los de F. La glucosa plasmática se mantuvo estable a lo largo de toda la prueba, y los valores de insulina plasmática e índice insulinogénico fueron

iguales o mayores que en F, aunque el incremento medio resultó similar en ambos grupos. El GLP-1 plasmático basal en FG fue $4,7 \pm 0,2$ nM ($n=4$), mayor ($p < 0,001$) que en F ($3,3 \pm 0,2$ nM, $n=7$), y este valor se mantuvo tras los 90 minutos de clamp (M&M,3).

En FO, la cantidad de glucosa intravenosa necesaria para el mantenimiento de la glucemia basal fue $5,95 \pm 0,32$ mmol·h⁻¹·Kg⁻¹, la mayor de las tres dietas con fructosa (F, FO y FG), pero no se llegó a recuperar el valor del grupo control alimentado sólo con dieta estándar ($p < 0,05$ vs C).

4. EFECTO DE LA DIETA EN EL CONTENIDO PANCREÁTICO DE INSULINA

Se analizó el peso húmedo y contenido en proteínas e insulina en el páncreas de la rata normal y diabética tipo 2, alimentada durante 50 días con pienso estándar, solo (grupo control C) o combinado con fructosa (F), aceite de oliva (AO), goma de guar (G) o caseína (CA).

Respecto al grupo C (**Tabla 7**), el peso del páncreas de la rata alimentada de forma crónica con F (resistente a insulina) fue similar; sin embargo, el grupo F tuvo una mayor concentración y, por tanto, cantidad total de proteínas. La insulina también fue mayor, no sólo la total sino también la relativa al peso del páncreas o contenido proteico ($p < 0,01$ o menor, $n=6-8$ para todos).

Tabla 7. Contenido pancreático de proteínas e insulina, en la rata alimentada con dieta C o F

| | C | F |
|------------------------------|---------------|--------------------------|
| Peso húmedo (g) | 1,0±0,1 (11) | 1,1±0,1 (8) |
| <u>Contenido proteico</u> | | |
| mg totales | 68,3±5,3 (11) | 106±11 (8) ^b |
| mg/g peso húmedo | 67,8±2,2 (11) | 99±8,7 (8) ^b |
| <u>Contenido en insulina</u> | | |
| µg/páncreas | 32,6±2,1 (11) | 120±11 (8) ^a |
| ng/mg proteína | 498±38 (11) | 1139±13 (8) ^a |

Media±EEM (n=número de individuos); a: $p < 0,001$; b: $p < 0,01$; ambas vs C.

También respecto a C, en la rata alimentada con AO durante 50 días, tanto el peso húmedo como el contenido proteico del páncreas fueron similares; tampoco hubo diferencias entre la rata normal y diabética. Aunque el contenido de insulina (**Fig. 39**) fue, de entrada, mucho menor ($p < 0,001$) en la rata diabética ($9,13 \pm 1,04$ ng/mg proteína, $n=20$) que en la rata normal ($35,9 \pm 3,22$, $n=16$), la dieta AO no modificó significativamente esos valores.

El páncreas de la rata normal alimentada crónicamente con G no proporcionó diferencias significativas con el del grupo C, ni en tamaño, ni en contenido en proteínas o insulina.

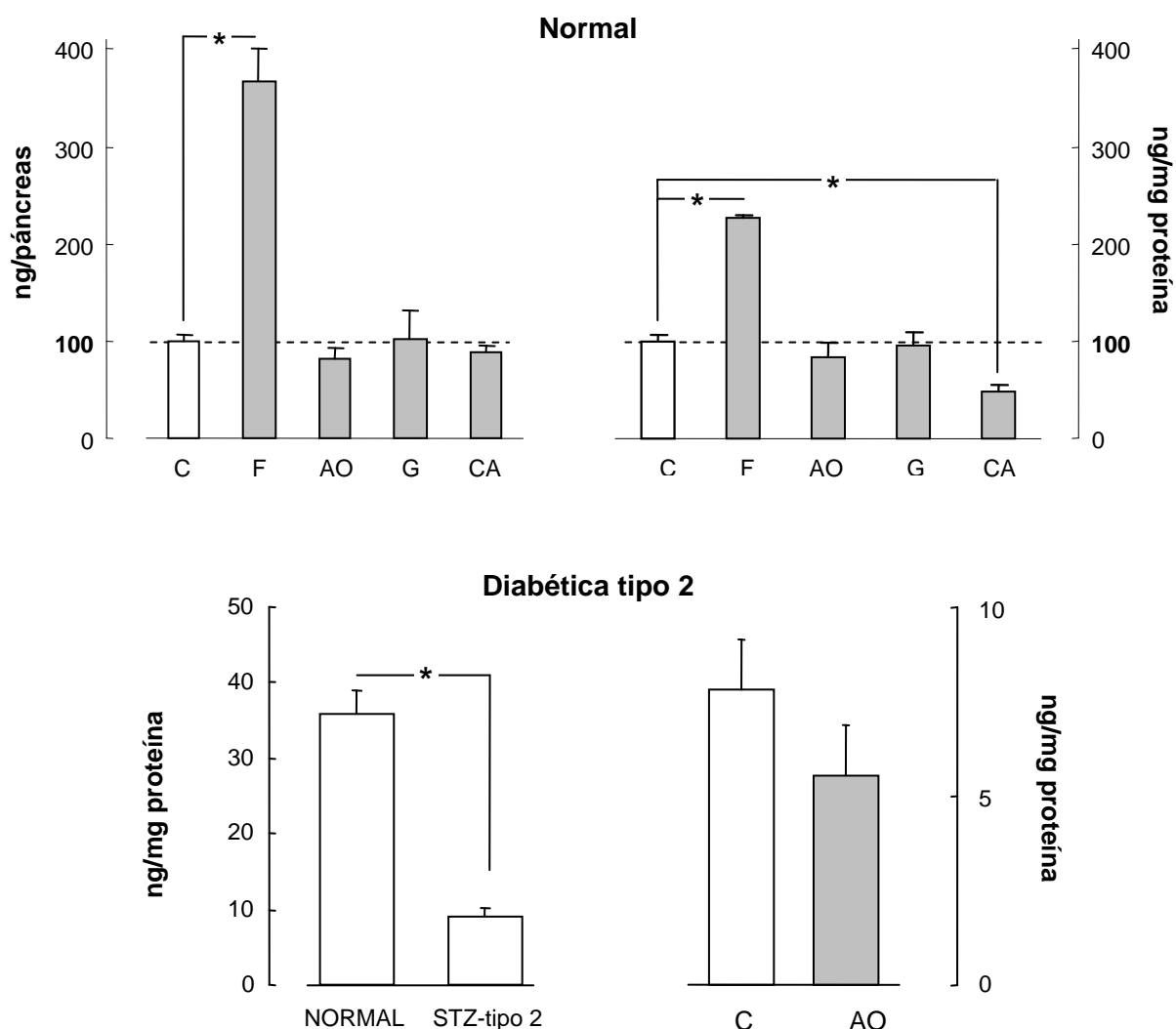


Fig. 39. Contenido pancreático de insulina respecto al control en la rata normal (□) y diabética (■), tras alimentación crónica con pienso estándar (C) o complementado con fructosa (F), aceite de oliva (AO), guar (G) o caseína (CA). Media±EEM, n=5–30 individuos; *: $p<0,05$.

En la rata normal alimentada con CA, tanto el peso húmedo como el contenido proteico total del páncreas fueron mayores ($p<0,005$) que en el grupo C (**Tabla 8** y **Fig. 39**), a pesar de que el peso corporal de ambos grupos era casi idéntico; la cantidad de proteínas, relativa al peso, también fue similar en ambos, con una media conjunta de 69 ± 1 mg/g ($n=13$). Respecto a C, el contenido de insulina respecto al peso o cantidad de proteína fue menor ($p<0,05$) en la rata alimentada con CA; sin embargo, no se detectaron diferencias en la insulina total, probablemente debido a una cierta hipertrofia del páncreas observada en el grupo CA.

Tabla 8. Características del páncreas de la rata alimentada con dieta estándar (C) o estándar suplementada con caseína (CA). Media±EEM (n=número de individuos).

| | C | CA |
|------------------------------|---------------|----------------------------|
| Peso húmedo (g) | 0,88±0,05 (5) | 1,28±0,08 (8) ^c |
| <u>Contenido proteico</u> | | |
| mg totales | 54,8±2,7 (5) | 96,8±6,2 (8) ^d |
| mg/g peso húmedo | 61,8±2,1 (5) | 76,4±0,6 (8) |
| <u>Contenido en insulina</u> | | |
| μg/páncreas | 29,2±2,4 (5) | 25,5±2,6 (8) |
| μg/g peso húmedo | 33,5±3,4 (5) | 20,5±2,4 (8) ^b |
| ng/mg proteína | 549±64 (5) | 272±32 (8) ^a |

a: $p<0,05$; b: $p<0,01$; c: $p<0,005$; d: $p<0,001$, todos vs C.

5. EFECTO DE LA DIETA SOBRE EL CONTENIDO INTESTINAL DE GLP-1

Se analizó el peso húmedo y contenido en proteínas y GLP-1 en el yeyuno, íleon, ciego y colon de la rata normal y diabética tipo 2, alimentadas durante 50 días con pienso estándar, solo (grupo control, C) o combinado con fructosa (F), aceite de oliva (AO), goma de guar (G) o caseína (CA).

En el grupo F (**Fig. 40**), el peso húmedo y contenido proteico del intestino delgado (yeyuno e íleon) fue mayor ($p < 0,02$ o menor) que en la rata de peso similar alimentada con pienso estándar (C), mientras que el del colon y ciego fueron menores ($p < 0,04$ o menor), sin diferencias en el peso total del intestino.

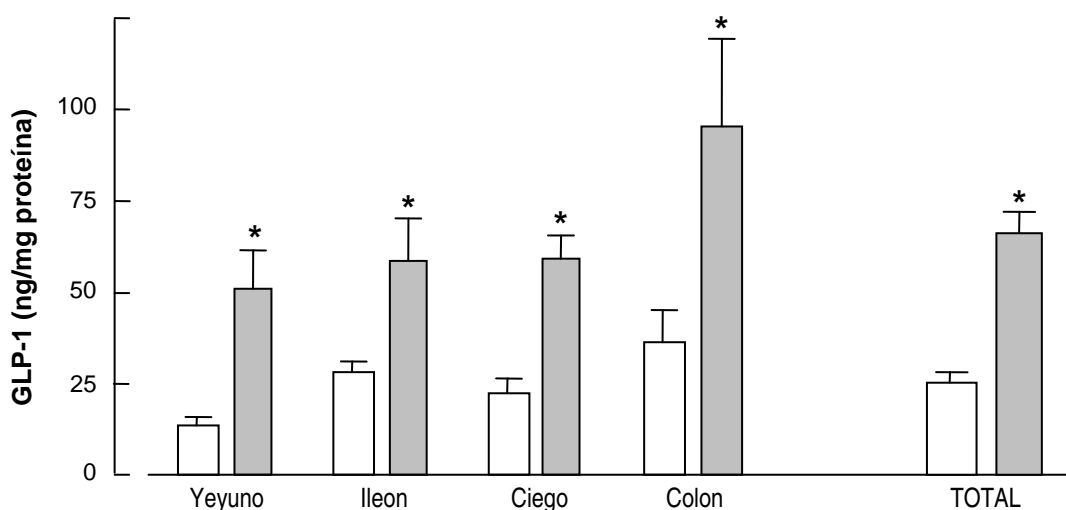


Fig. 40. Contenido de GLP-1 en el yeyuno, íleon, ciego y colon de rata normal tratada durante 50 días con dieta C (□) o F (■). Media±EEM, n=8-56 individuos; *: $p < 0,001$ vs C.

El contenido total de GLP-1 en el grupo F fue claramente mayor ($p < 0,002$) que en el control (C) en cualquiera de las cuatro porciones intestinales analizadas, así como en el intestino total; esta diferencia se mantuvo al relacionar el valor de GLP-1 al peso húmedo total del intestino ($p < 0,002$) o al contenido proteico de éste ($p < 0,001$). La diferencia más notable se manifestó en el yeyuno, con un GLP-1 total que resultó ser el $1616 \pm 328\%$ del detectado en el grupo C (n=8-14). Tras referir este valor al del

contenido proteico, el GLP-1 en F resultó ser un $360\pm 38\%$ del de C en el yeyuno ($n=8-14$), y un $266\pm 8\%$ en el total del intestino ($n=32-56$).

En la rata normal alimentada con AO durante 50 días, el contenido de GLP-1 del intestino (**Fig. 41**) fue similar al de C, excepto en el ciego y colon de la hembra, donde resultó sensiblemente mayor ($p<0,05$, $n=8$) y menor ($p<0,007$, $n=8$), respectivamente..

En la rata alimentada con G, se observó un colon de mayor tamaño que en la C, tanto en relación al peso húmedo ($p<0,004$) como al contenido proteico ($p<0,03$); el resto de los segmentos intestinales fueron de tamaño similar en ambos grupos. El contenido total de GLP-1 fue menor ($p<0,004$) en el intestino de la rata G, diferencia debida en parte al menor tamaño del colon, ya que si se corrige por peso húmedo ($p<0,02$) o cantidad de proteínas ($p<0,08$) se reducen las diferencias.

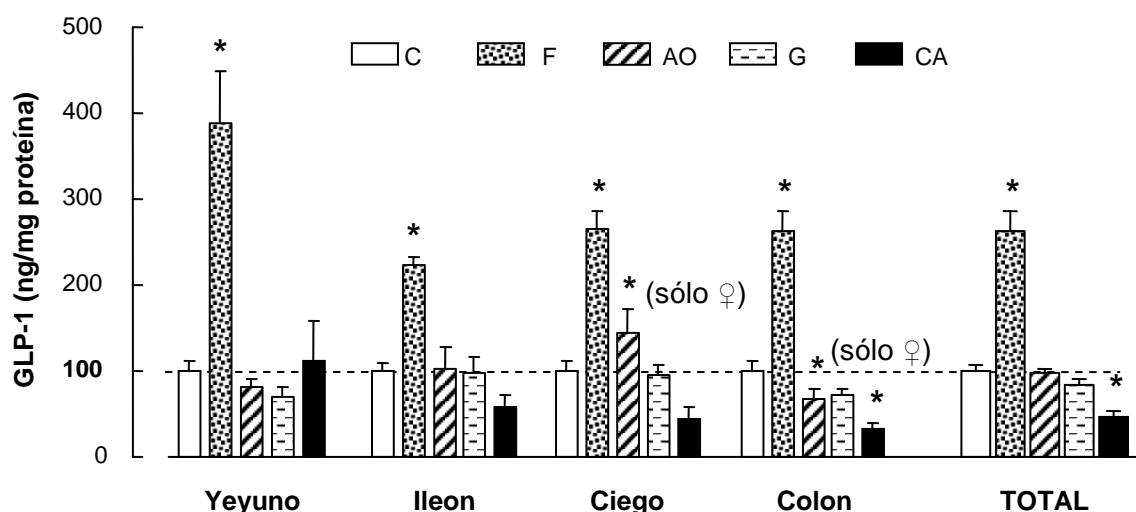


Fig. 41. Contenido de GLP-1 en el intestino de la rata normal alimentada durante 50 días con pienso estándar combinado con fructosa (F), aceite de oliva (AO), guar (G) o caseína (CA), respecto al pienso estándar (C). Media \pm EEM, $n=6-56$ individuos); *: $p<0,001$ vs C.

En la rata alimentada de forma crónica con CA durante 50 días, el peso húmedo de los cuatro segmentos del intestino fue similar al de C. El contenido de GLP-1 en el grupo C varió ($p<0,05$) entre un segmento y otro, mientras que, en los animales alimentados con CA, fue similar en todos. El contenido total de GLP-1 en el intestino resultó ser unas tres veces menor ($p<0,02$) en el grupo CA que en el C, diferencia atribuible al marcado descenso ($p<0,001$) de GLP-1 en el colon; incluso en el ciego e íleon del

grupo CA, su contenido relativo al peso húmedo fue, tan sólo, un $44,7\pm 21,5\%$ ($n=15$, $p<0,025$) del detectado en C.

Respecto a la rata normal, el intestino del modelo diabético presentó un peso y una densidad proteica aparentemente menores. La concentración de GLP-1 (13 ± 1 ng/mg proteína, $n=44$, **Fig. 42**), fue aproximadamente la mitad (27 ± 3 , $n=31$), y aunque esta diferencia alcanzó significación estadística en todos los segmentos analizados ($p<0,05$ o menor, $n=8-11$), la mayor se produjo en el colon ($p<0,002$), con $39,4\pm 3,0$ ng/mg ($n=33$) en la rata normal vs $16,7\pm 1,1$ ng/mg ($n=11$) en la diabética tipo 2, representando el $271\pm 6\%$ de C.

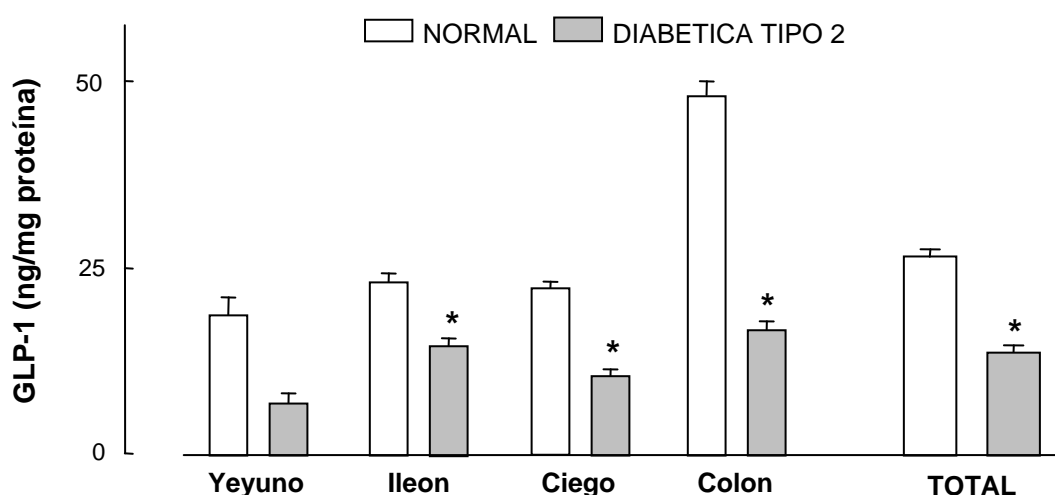


Fig. 42. Contenido de GLP-1 en el intestino de la rata normal y diabética tipo 2 alimentada con pienso estándar (media \pm EEM, $n=11-33$ individuos); *: $p<0,001$.

En la rata diabética tipo 2, la dieta AO disminuyó ($p<0,001$ o menor) el contenido de GLP-1 del íleon, ciego y colon, así como el total del intestino. El peso corporal y el tamaño de los cuatro segmentos intestinales fue similar tras ser alimentada de forma crónica con AO o C (**Fig. 43**); el contenido total de GLP-1 en todos los segmentos analizados también fue el mismo en el caso de los machos, pero menor ($p<0,001$ vs C) en el de las hembras AO, las cuales, además, tuvieron un menor contenido proteico que las hembras C; pero tras referir el valor a la cantidad de proteínas o peso del órgano, el contenido medio de GLP-1 en cada uno de los segmentos del intestino fue menor en los animales AO de ambos sexos, alcanzando significación estadística ($p<0,001$) en todos, excepto el yeyuno. El GLP-1 medio del intestino fue $7,3\pm 0,4$ ng/mg

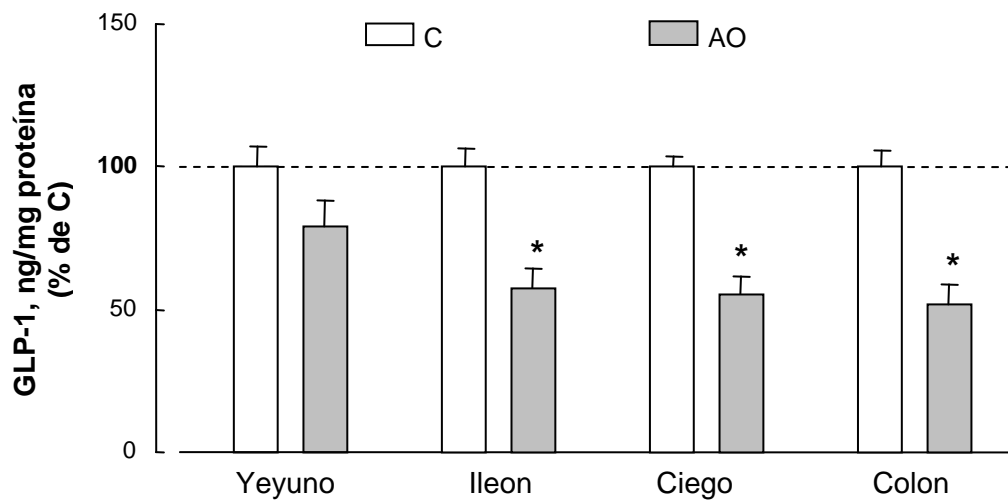


Fig. 43. Contenido de GLP-1 en el intestino de la rata diabética tipo 2 (media±EEM, n=10-32 individuos); * $p < 0,001$ vs C.

de proteína en el grupo AO, frente a los $12,7 \pm 0,5$ (n=28) del C.

DISCUSIÓN

La preocupación por el conocimiento de las características bioquímicas, metabólicas y fisiológicas de los nutrientes que componen la dieta ha ido en aumento en las últimas décadas; la creciente conciencia de que “somos lo que comemos”, los nuevos avances técnicos y el interés comercial han hecho de la investigación nutricional un asunto de máxima actualidad, incluso fuera de la comunidad científica. De este modo, somos constantemente testigos de la aparición de pirámides nutricionales que creen describir la dieta ideal para llevar una vida saludable, y que son inmediatamente reemplazadas por otras nuevas muy diferentes. Lo cierto es que no existe un verdadero consenso a este respecto, y las actuales investigaciones ponen de manifiesto que, al igual que no hay enfermedades, sino enfermos, no existe la dieta ideal, sino una combinación de alimentos óptima para cada individuo. Los estudios nutricionales cobran aún más importancia en el caso de las personas que padecen algún trastorno en la homeostasis de la glucosa, fenómeno cada vez más común en todo el mundo. Los resultados del presente trabajo, realizado en la rata normal, en un modelo experimental de diabetes y otro de resistencia a insulina, muestran los efectos de los componentes básicos de la dieta —carbohidratos, grasa, fibra y proteínas— sobre la homeostasis de la glucosa, la secreción y contenido pancreático de insulina, y la secreción y contenido intestinal de GLP-1.

La **tabla 9** recoge los cambios cualitativos específicos operados tras cada dieta experimental en la rata normal, relativos a la alimentación control con pienso estándar. La administración intragástrica de **fructosa** parece mejorar la tolerancia a glucosa oral, lo cual podría ser debido, al menos en parte, a la capacidad de la F1P —generada a partir de fructosa— de liberar a la glucoquinasa de la acción inhibitoria de la F6P [Malaisse 1990, Van Shaftingen 1989]; también mejora ligeramente la respuesta secretora de la célula β , lo que podría atribuirse a una modulación de la actividad glucoquinasa del islote pancreático por su proteína reguladora [Malaisse 2002]. Con respecto a ello, el hecho de que la glucosa estimule la fosforilación de fructosa, tanto en el islote pancreático [Moukil 2001, Scruel 1997] como en el hepatocito [Malaisse 2002a], podría representar un factor regulador significativo; este fenómeno asegura la conversión

Tabla 9. Efecto de los distintos elementos nutricionales en la rata normal, tras su administración aguda o crónica, con respecto a la dieta estándar control.

| | Fructosa | | | Aceite de oliva | | Guar | | Caseína | |
|---------------------------------------|----------|--|---|-----------------|---------|-------|---------|---------|---------|
| | aguda | crónica 50% en pienso 20% en agua | | aguda | crónica | aguda | crónica | aguda | crónica |
| <i>Ganancia de peso</i> | ■ | ↓ | ↓ | ■ | ↑ | ■ | ↓ | ■ | — |
| <i>Ingestión calórica</i> | ■ | ↘ | ↑ | — | — | — | ↑ | ↘ | ↓ |
| <i>Glucemia en ayunas</i> | ■ | ↑ | — | ■ | — | ■ | ↗ | ■ | ↑ |
| <i>Glucemia post-prandium</i> | ■ | — | — | ↘ | — | ↘ | ↘ | ↓ | ↓ |
| <i>Tolerancia a glucosa</i> | ↗ | ↓ | ■ | ↗ | ↗ | — | ↑ | ■ | ↘ |
| <i>Secreción de insulina</i> | ↑ | ↗ | ↑ | ↗ | ↑ | ↘ | ↑ | ↑ | ↑ |
| <i>Insulina en páncreas</i> | ■ | ↑ | ■ | ■ | ↘ | ■ | — | ■ | ↓ |
| <i>Sensibilidad a insulina (HOMA)</i> | — | ↓ | ↓ | ↗ | ↑ | ↑ | ↘ | ↑ | ↓ |
| <i>Secreción de GLP-1</i> | ↗ | ↘ | ↑ | ↗ | ↗ | ↘ | ↘ | ↘ | ↗ |
| <i>GLP-1 en intestino</i> | ■ | ↑ | ■ | ■ | — | ■ | ↘ | ■ | ↓ |

—: sin cambio; ↗↘: tendente a mayor o menor; ↑↓: significativamente mayor o menor; ↑↓: mucho mayor o menor; ■: no procede.

eficiente de fructosa a glucosa en el hígado, como por ejemplo se observa en este trabajo tras la administración de fructosa sola. Los resultados aquí expuestos concuerdan con estudios recientes que documentan que, en el perro y en el hombre, pequeñas cantidades de fructosa, oral o intraduodenal, reducen la hiperglucemia e hiperinsulinemia post-*prandium* [Moore 2001, Shiota 2002]; y también con otros que ilustran que, en el hígado humano, la infusión intravenosa de fructosa estimula la síntesis de glucógeno en condiciones de euglucemia e hiperinsulinemia [Petersen 2001], lo cual indica un efecto favorable directo de la fructosa sobre el metabolismo hepático de la glucosa. En cuanto al islote, el trabajo de Moore y col. [2001] no aporta información que relacione la respuesta secretora de la célula β con la concentración plasmática de glucosa tras la administración de fructosa; pero los resultados del presente trabajo, aunque obtenidos en la rata, no excluyen la posibilidad de que los efectos observados puedan también darse en otras especies. Por ejemplo, Sievenpiper y col. [1998]

confirmaron que, en el hombre, la respuesta glucémica post-*prandium* es menor tras la administración de fructosa sola que tras la de la misma cantidad de sacarosa (25 g); no obstante, ese estudio no incluía información sobre niveles de fructosa plasmática.

La exposición crónica a una dieta rica en fructosa provoca hipofagia y, como consecuencia, reduce la ganancia de peso; además, incrementa la secreción de insulina, y aumenta la presencia de la hormona en sangre y páncreas, tanto en la rata en ayunas como saciada (**Tabla 9**). Los resultados de este trabajo muestran un claro efecto negativo de la exposición prolongada a dicha dieta —50 días— sobre la sensibilidad a insulina y la tolerancia a la glucosa; resultados de experimentos de este laboratorio, posteriores a los incluidos en este trabajo, sugieren que podría generarse una resistencia equivalente en la mitad de tiempo, unos 25 días. El claro aumento del contenido intestinal de GLP-1 provocado por fructosa podría explicar, en parte, los resultados obtenidos con oligofructosa [Kok 1998], como el efecto de la hexosa libre, producto de su hidrólisis. Existen diferencias en los resultados en función del modo de administración de la fructosa; así, al estar disuelta al 20% en el agua de bebida, beben más, y el aporte calórico se ve compensado e igualado con respecto al de la dieta control, con lo que la pérdida de peso es menor que cuando este azúcar se ingiere al 50% con el pienso; en este caso, aunque lo ingerido es menor, se observa una mayor glucemia en ayunas, una reducción en la funcionalidad de la célula β , y ausencia de modificación en el ritmo de secreción de GLP-1, cuando es que la fructosa administrada en agua de bebida sí mejora la secreción del péptido. La insulinoresistencia puede desarrollarse con un suplemento relativamente pequeño de fructosa; un aumento de la cantidad del azúcar por encima del 20% no la empeora, por lo que debe existir un umbral efectivo por debajo de esta cantidad. De hecho, trabajos publicados a este respecto muestran una gran heterogeneidad en la respuesta a la fructosa en función del tiempo, cantidad y tipo de administración —ingerida (sólida o líquida) o intragástrica [Kong 1999, Shiota 2002, Sievenpiper 1998, Suzuki 2004]—.

La administración aguda de una dieta rica en **aceite de oliva** a la rata normal induce una mejor tolerancia a glucosa intragástrica, menor glucemia post-*prandium* y una mayor secreción y acción de la insulina, aunque todas estas acciones son moderadas. La administración crónica del aceite confirma todos los efectos de la ingestión aguda,

pero alcanzando, en este caso, diferencias significativas con la dieta estándar control; además, la rata gana más peso que cuando se alimenta sólo con pienso estándar —sin modificación del aporte calórico—, y se observa un mayor valor de GLP-1 en la sangre, pero no en el intestino. Aunque en un primer momento la exposición a largo plazo del aceite puede presentar la aparente desventaja del mayor aumento de peso, esta dieta produce, en compensación, una mejoría en la tolerancia a la glucosa, que puede ser atribuida, al menos en parte, a una mayor respuesta de insulina a la hexosa administrada por vía enteral, y que a su vez podría deberse a un aumento del GLP-1 circulante. Esto está de acuerdo con resultados de trabajos previos, que demuestran tanto la mejoría en la tolerancia a la glucosa como la relación de ésta con una mayor secreción de GLP-1 [Rocca 2001]; y a juzgar por el valor del HOMA, la sensibilidad a la insulina parece mejorar, pero los resultados no permiten concluir si ello se debe al incremento observado en la sensibilidad a la hormona en sus células diana, ya que su secreción también se ve aumentada. Las posibles razones de la disminución del contenido de insulina en el páncreas en estado saciado suponen una incógnita que debe ser investigada.

La administración concomitante de **goma de guar**, durante una sobrecarga intragástrica de glucosa, reduce el incremento de glucosa e insulina en plasma, sin afectar perceptiblemente al de GLP-1 (**Tabla 9**). Dicha combinación no modifica el descenso de glucagón que se observa tras glucosa sola. El incremento de glucosa, insulina y GLP-1, tras una comida rica en guar, es menor que tras la ingestión de pienso estándar. El tratamiento durante siete semanas con una dieta rica en guar provoca una menor ganancia de peso, a pesar de una mayor ingestión calórica; tampoco afecta a la tolerancia a la glucosa intragástrica ni al contenido plasmático de GLP-1, pero sí induce un mayor aumento de la insulinemia y del índice insulínogénico. Dado que el bolo intragástrico de glucosa utilizado en el presente estudio no incluía guar, la respuesta secretora observada en la célula β probablemente refleja su sensibilidad a cambios en la concentración extracelular de la hexosa. De ser así, los resultados sugieren un efecto positivo del guar en la estimulación de la secreción de insulina dependiente de glucosa, lo cual podría deberse a la moderación del pico de glucemia observada en los experimentos a corto plazo. Se sabe que la respuesta secretora dependiente de glucosa puede verse influida por cambios rápidos de

glucemia; por ejemplo, el descenso de la secreción de insulina durante el ayuno es suprimido por la inyección en pulsos de glucosa intravenosa, que causa ondas muy rápidas de hiperglucemia, a pesar del aporte calórico despreciable [Juhi 2005]. En la rata normal, la administración aguda de guar mejora la sensibilidad a la insulina, efecto ya observado en el hombre normal [Landin 1992] y en la rata diabética tipo 2 [Cameron-Smith 1997] pero no en el paciente tipo 1 [Bruttomesso 1991]. Sin embargo, la continuidad del tratamiento a lo largo de siete semanas anula la mejoría observada en las pruebas agudas. Los resultados de los presentes experimentos con guar confirman su efecto inmediato sobre la glucemia, insulinemia y tolerancia a glucosa [Braaten 1991, Ebeling 1988, Fairchild 1996, Groop 1993a, Kirsten 1991, Lafrance 1998, Landin 1992, Morgan 1990, Russo 2003, Sierra 2001, Torsdottir 1989, Vuorinen-Markkola 1992a]. Cabe recordar, como ya se mencionó en la introducción, que la adición de guar a la dieta de la rata normal [Begin 1989, Vachon 1988] o intolerante a la glucosa [Cameron-Smith 1997, Suzuki 2004] mejora la tolerancia a ésta y la sensibilidad a la insulina, y reduce la insulinemia post-*prandium*, además de mejorar la secreción de GLP-1 en determinados casos [Adam 2005, Dhillon 2004].

La cantidad de pienso rico en **caseína** ingerido por la rata normal en 15 minutos es menor que la de pienso estándar control (**Tabla 9**). La respuesta secretora de la célula β , la independiente de glucosa, es mayor en los animales que ingirieron caseína, a pesar de darse en éstos un menor incremento de la glucemia; la concentración media de GLP-1, sin embargo, no se vio afectada. Este resultado es consistente con el poder insulínico de ciertos aminoácidos [Ørskov 1991, Prieto 2003, Leech 2003], pero se contrapone con el efecto directo de los aminoácidos sobre la secreción de GLP-1 propuesto por Reimann [2004], entre otros; también minimiza el papel de esta hormona en la hipofagia inducida por caseína. El efecto saciante de las proteínas es bien conocido, y ya hay estudios que lo relacionan con el GLP-1 [Lejeune 2006]. La exposición a una dieta rica en caseína durante siete semanas no afecta al ritmo de ganancia de peso, ni a la glucosa, insulina o GLP-1 en la sangre de la rata saciada. Sin embargo, sí incide sobre la glucemia en ayunas, que es mayor que la del grupo control alimentado con pienso estándar, lo que bien podría reflejar la capacidad de ciertos aminoácidos como precursores gluconeogénicos. La mayor glucemia basal coincide con una mayor concentración de insulina en la rata alimentada con caseína, sin que se detecten

diferencias en el GLP-1; además, la caseína disminuye el contenido final de insulina en páncreas. La media de glucemia e insulinemia tras una sobrecarga intragástrica de glucosa, también es mayor con caseína, y este efecto no se relaciona con cambios en la concentración de GLP-1.

Un exceso sostenido de caseína puede ser causa de insulinoresistencia, como indica el alto valor del HOMA observado en animales expuestos a altas dosis de la proteína de forma crónica, no detectada, sin embargo, tras su administración aguda. Las altas concentraciones de glucosa e insulina plasmáticas observadas 120 minutos después de glucosa oral, podrían ser indicativas incluso de una prediabetes. La importancia de la dosis de caseína se ve reflejada en el hecho de que su ingestión aguda mejora claramente la sensibilidad a insulina, mientras que el consumo continuado la empeora.

El modelo de **diabetes tipo 2** utilizado en este estudio (**Tabla 10**) tiene, de entrada, un menor ritmo de ganancia de peso que la rata normal; también presenta una mayor glucemia basal y postprandial, que el tratamiento crónico con pienso estándar parece, curiosamente, normalizar, sin modificar no obstante la tolerancia a la glucosa, que es marcadamente peor que en la rata sana. Además, hay una clara disminución de la secreción —al menos tras la ingestión aguda de alimento— y contenido de insulina y sensibilidad a ésta, así como del contenido y secreción de GLP-1.

Algunos de los efectos de la dieta enriquecida con aceite de oliva en la rata diabética son similares a los inducidos en la rata normal. En primer lugar, la ingestión aguda de aceite de oliva incrementa la insulina y GLP-1 plasmáticos con respecto al pienso estándar. Además, la exposición crónica al aceite tampoco altera la concentración de glucosa, insulina o GLP-1 en sangre. Por último, el área de glucemia de la rata diabética expuesta a una sobrecarga intragástrica de glucosa también aumenta el día 19 respecto a la dieta estándar, y no el 36. Pero a diferencia con la rata normal, la diabética, además de ganar menos peso, presenta, como era de esperar, una mayor glucemia post-*prandium* y menor tolerancia a la glucosa, una secreción, acción (más notable en la hembra) y contenido pancreático de insulina, claramente disminuidos, y una menor secreción y contenido intestinal de GLP-1, especialmente en el colon. En la rata diabética, respecto a la normal, el aceite provoca un incremento de peso claramente menor, y también menor que el producido tras alimentación con pienso

estándar; además, el contenido de GLP-1 del intestino es menor tras el tratamiento crónico. Existen muchos trabajos que argumentan en favor de una acción positiva de MUFA sobre el control glucémico en estados diabéticos [Garg 1994, Low 1996, Parrillo 1992, Pohl 2005, Riccardi 2000, Wright 1998], además de que parecen tener efectos beneficiosos sobre los perfiles lipídicos, sin incrementar la ganancia de peso [Gerhard 2004, Garg 1998].

Tabla 10. Características cualitativas del modelo de rata diabética tipo 2, inducido por tratamiento con estreptozotocina (izquierda), y efecto del aceite de oliva en la diabética, respecto a la alimentada con pienso estándar control C (derecha).

| | Pienso estándar control | | Aceite de oliva | |
|--------------------------------|--------------------------------|---------|------------------------|---------|
| | STZ-Tipo 2 vs normal | | STZ-Tipo 2: AO vs C | |
| | aguda | crónica | aguda | crónica |
| <i>Ganancia de peso</i> | ↓ | ↘ | ■ | ↓ |
| <i>Ingestión calórica</i> | ↑ | ? | ↗ | ? |
| <i>Glucemia en ayunas</i> | ↑ | ↘ | | ↘ |
| <i>Glucemia post-prandium</i> | ↑ | ↘ | ↗ | ↗ |
| <i>Tolerancia a glucosa</i> | ■ | ↓ | ■ | ↗♀ ↓♂ |
| <i>Secreción de insulina</i> | ↓ | ? | ↗ | ↗♀ ↓♂ |
| <i>Insulina en páncreas</i> | ■ | ↓ | ■ | ↘ |
| <i>Sensibilidad a insulina</i> | ↓♀ ↘♂ | ↓ | ↓ | ? |
| <i>Secreción de GLP-1</i> | ↓ | ↓ | ↑ | ↓ |
| <i>GLP-1 en intestino</i> | ■ | ↓ | ■ | ↓ |

—: sin cambio; ↗↘: tendente a mayor o menor; ↑↓: significativamente mayor o menor; ↑↓: mucho mayor o menor; ?: cuestionable; ■: no procede.

A diferencia de la rata normal, la insulinemia no se modifica en respuesta a una sobrecarga intragástrica de glucosa, y el índice insulinogénico no sólo no aumenta, sino que, paradójicamente, disminuye en la rata diabética. Esto muestra la perturbación en la respuesta secretora dependiente de glucosa de la célula β en este modelo experimental de diabetes. Por último, el aceite mejora la sensibilidad a insulina en la rata normal, empeorándola en cambio en la diabética. Sorprende el hecho de que, en la

rata normal, no hay diferencias en función del género en el resultado de ningún parámetro, mientras que en el modelo diabético, el aceite de oliva agrava la intolerancia a la glucosa en el macho, mejorándola, sin embargo, en la hembra.

La **tabla 11** ilustra los efectos cualitativos del aceite de oliva y goma de guar en la rata con **resistencia a insulina** inducida por fructosa. Los resultados indican que la administración crónica de aceite de oliva revierte la hipofagia y pérdida de peso provocada por la fructosa (**Tabla 9**). El tratamiento crónico con guar previene el incremento de glucemia en ayunas inducido por la hexosa, manteniendo baja la ingestión de alimento; además, el guar crónico da lugar a una tendencia a la mejoría de la sensibilidad a insulina, efecto opuesto al observado en la rata normal si se considera el valor del HOMA (**Tabla 9**). Estas observaciones argumentan a favor de la ingestión de guar, más que de aceite, para contrarrestar el efecto de la fructosa exógena sobre la homeostasis de la glucosa.

Tabla 11. Efecto del aceite de oliva y guar en el modelo de resistencia a insulina generado con fructosa, tras su administración aguda o crónica, con respecto a la dieta con sólo fructosa.

| | Fructosa | |
|---------------------------------------|-----------------|------|
| | Aceite de oliva | Guar |
| <i>Ganancia de peso</i> | ↑ | — |
| <i>Ingestión calórica</i> | ↑ | — |
| <i>Glucemia en ayunas</i> | — | ↓ |
| <i>Glucemia postprandial</i> | — | ↓ |
| <i>Secreción de insulina</i> | ↗ | ↗ |
| <i>Sensibilidad a insulina (HOMA)</i> | ↘ | ↘ |
| <i>Secreción de GLP-1</i> | ↓ | ↓ |
| <i>Demanda de glucosa</i> | ↘ | ↗ |

—: sin cambio; ↗↘: tendente a mayor o menor; ↑↓: significativamente mayor o menor.

En conjunto, los resultados de este trabajo permiten establecer ciertas consideraciones con respecto a la influencia de la dieta en el control glucémico. En primer lugar, dosis moderadas de fructosa pueden ser beneficiosas, pero la ingestión excesiva o continuada de este azúcar es altamente desaconsejable. Los ácidos grasos monoinsaturados favorecen el control glucémico en individuos sanos [Riccardi 1993], y esto puede ser debido a que actúan como secretagogos de GLP-1 [Beysen 2002, Brubaker 1998, Reimer 2001, Thomsen 2003], sirviendo de enlace entre la exposición a la dieta y los cambios en la secreción de insulina, observados tanto en ayunas como en estado saciado. Por ello, la continuidad de la dieta con aceite de oliva a lo largo del tiempo no sólo no perjudica, sino que mantiene los efectos de su administración aguda. Sin embargo, esta misma manipulación de la dieta con aceite no modifica la tolerancia a glucosa, ni la secreción de insulina, en el modelo de diabetes tipo 2 utilizado en este estudio. Dentro de los límites de la presente investigación, se puede concluir que si bien, aparentemente, no se observa un claro beneficio del aceite de oliva en la rata diabética —aparte de la importante reducción de su peso corporal—, los resultados parecen indicar que una dieta de estas características ayudaría, al menos, a evitar o enlentecer el normal deterioro de las condiciones metabólicas que se da en este tipo de diabetes. De hecho, trabajos previos han mostrado un claro beneficio de la ingestión de aceite de oliva con la dieta en el hombre diabético tipo 2 [Thomsen 2003]. Inevitablemente, se plantea la cuestión de si tal contradicción puede estar relacionada con diferencias en la patofisiología de la disfunción de la célula β entre el hombre y el presente modelo animal de diabetes.

Por su parte, el guar ralentiza la respuesta hormonal a los nutrientes en la rata normal, posiblemente debido a su efecto sobre el vaciamiento gástrico, y mejora la respuesta de la célula β a la glucosa, a pesar de que el tratamiento crónico con la fibra disminuye el contenido intestinal de GLP-1. Estos hallazgos justifican el interés actual por encontrar un modo óptimo de utilización del guar en la dieta de los pacientes diabéticos [Vinik 1988].

Por último, la administración a largo plazo de una dieta rica en concentración moderada de caseína no tiene ningún efecto indeseable sobre los parámetros bioquímicos relacionados con la homeostasis de la glucosa en la rata normal. La menor reducción

de la glucemia tras ayuno nocturno podría ser incluso un fenómeno beneficioso para prevenir episodios hipoglucémicos en determinadas situaciones. Además, la caseína colabora en el control de la cantidad de alimento a ingerir —propiedad muy interesante para el paciente obeso—, efecto, no obstante, independiente de la secreción de GLP-1. La concentración del péptido en el intestino experimenta una inesperada disminución, tanto tras alimentación con guar —podría estar relacionada con el retraso en la respuesta de GLP-1 observada tras la sobrecarga intragástrica— como con caseína; la repercusión y posibles consecuencias de esto están abiertas a especulación.

CONCLUSIONES

Si bien la fructosa administrada en exceso produce resistencia a insulina, su inclusión moderada en la dieta podría beneficiar al paciente con diabetes asociada a obesidad, porque:

- En la rata normal, la fructosa es anorexígena, reduce la ganancia de peso, y coopera en la acción insulínica de la glucosa
- La presencia de fructosa en la dieta estimula la secreción de insulina y GLP-1 pero, a largo plazo, acaba perjudicando la sensibilidad a insulina

La inclusión en la dieta de ácidos grasos monoinsaturados, a través de su acción sobre la secreción de GLP-1, puede ser ventajosa en la prevención de estados diabéticos; también sería beneficiosa en situaciones de diabetes asociada a obesidad, ya que:

- En la rata normal, el aceite de oliva mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a insulina, e incrementa la respuesta secretora de las células β pancreática y L intestinal
- En la rata diabética tipo 2, el aceite de oliva reduce el aumento de peso e incrementa la secreción de GLP-1, sin producir efectos indeseables en otros parámetros

La inclusión moderada de guar en la dieta puede ayudar al control glucémico y al mantenimiento del índice de masa corporal normal, con un bajo riesgo de hiperglucemia, debido a que:

- En la rata normal, reduce la ganancia de peso, y mejora la tolerancia a la glucosa y la respuesta secretora de la célula β
- En la rata resistente a insulina, mejora los perfiles glucémicos y la sensibilidad a insulina, sin afectar al peso corporal.

La caseína, en dosis moderadas, podría ser útil para prevenir la hipoglucemia provocada en determinadas situaciones tales como el ayuno nocturno, en base a lo siguiente:

- En la rata normal, una dosis moderada de caseína provoca hipofagia, estimula la respuesta secretora de la célula β y mejora la sensibilidad a la insulina
- Además, provoca un aumento de la glucemia en ayunas, y un descenso de la *post-prandium*

La proporción de cada nutriente en la dieta es tan importante o más que la composición de ésta, como se deduce de las siguientes observaciones:

- Salvo en el caso del aceite de oliva, todos los nutrientes analizados muestran acciones fundamentalmente diferentes, o incluso opuestas, en función de la duración de su administración
- En el caso de la fructosa, los efectos también varían en función de su proporción y modo de administración

BIBLIOGRAFIA

- Adam TC, Westerterp-Plantenga MS** (2005) *Nutrient-stimulated GLP-1 release in normal-weight men and women.* Horm Metab Res 37:111-7.
- Ahren B** (2004) *Sensory nerves contribute to insulin secretion by glucagon-like peptide-1 in mice.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 286:R269-72.
- Ahren B, Holst JJ, Yu S** (2000) *1,5-Anhydro-D-fructose increases glucose tolerance by increasing glucagon-like peptide-1 and insulin in mice.* Eur J Pharmacol 26;397:219-25.
- Alvarez, E., Roncero, I, Chowen, JA, Thorens, B, Blázquez, E** (1996) *Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain.* J. Neurochem. 66, 920-7.
- Astrup A, Finer N** (2000) *Redefining type 2 diabetes: 'diabesity' or 'obesity dependent diabetes mellitus'?* Obes Rev 1:57-59.
- Attali V, Parnes M, Ariav Y, Cerasi E, Kaiser N, Leibowitz G** (2006) *Regulation of insulin secretion and proinsulin biosynthesis by succinate.* Endocrinology 147:5110-8.
- Aziz A, Anderson GH** (2003) *Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, interacts with proteins and their products of digestion to suppress food intake in rats.* J Nutr 133:2326-30.
- Bailey CJ** (2005) *Drugs on the horizon for diabesity.* Curr Diab Rep 5:353-9.
- Baldissera FG, Holst JJ** (1986) *Glicentin 1-61 probably represents a major fraction of glucagon-related peptides in plasma of anaesthetized uraemic pigs.* Diabetologia 29:462-7.
- Basciano H, Federico L, Adeli K** (2005) *Fructose, insulin resistance and metabolic dyslipidemia.* Nutr Metab (Lond) 1;2:5.
- Bataille D, Tatemoto K, Gespach C, Jornvall H, Rosselin G, Mutt V** (1982) *Isolation of glucagon-37 (bioactive enteroglucagon/oxyntomodulin) from porcine jejunum-ileum. Characterization of the peptide.* FEBS Lett 146:79-86.
- Beck-Nielsen H, Groop LC** (1994) *Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus.* J. Clin. Invest. 94:1714-21.
- Begin F, Vachon C, Jones JD, Wood PJ, Savoie L** (1989) *Effect of dietary fibers on glycemia and insulinemia and on gastrointestinal function in rats.* Can J Physiol Pharmacol 67:1265-71.
- Bell GI, Santerre RF, Mullenbach GT** (1983) *Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides.* Nature 21;302:716-8.
- Berghofer P, Peterson RG, Schneider K, Fehmann HC, Goke B** (1997) *Incretin hormone expression in the gut of diabetic mice and rats.* Metabolism 46:261-7.

Bergmeyer (1974) *Glucose determination with glucose oxidase and peroxidase. Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press (ed.) New York, pp. 1205-15.

Bessesen DH (2001) *The role of carbohydrates in insulin resistance*. J Nutr 131:2782S-6S..

Beysen C, Karpe F, Fielding BA, Clark A, Levy JC, Frayn KN (2002) *Interaction between specific fatty acids, GLP-1 and insulin secretion in humans*. Diabetologia 45:1533-41.

Blázquez, Alvarez E, Navarro M, Roncero I, Rodriguez-Fonseca F, Chowen JA, Zueco JA (1998) *Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide as a novel neuropeptide*. Mol Neurobiol 18:157-73.

Boden G (1997) *Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM*. Diabetes 46:3-10.

Bouchardat A (1883) *De la glycosurie ou Diabète sucré son traitement hygiénique*. Libraire Germer Baillière, Paris.

Braaten, Wood PJ, Scott FW, Riedel KD, Poste LM, Collins MW (1991) *Oat gum lowers glucose and insulin after an oral glucose load*. Am J Clin Nutr 53:1425-30.

Bradford MM (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding*. Anal Biochem 72:248-54.

Brubaker PL, Drucker DJ (2004) *Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system*. Endocrinology 145:2653-9.

Brubaker PL, Schloos J, Drucker DJ (1998) *Regulation of glucagon-like peptide-1 synthesis and secretion in the GLUTag enteroendocrine cell line*. Endocrinology 139:4108-14.

Brubaker PL, So DC, Drucker DJ (1989) *Tissue-specific differences in the levels of proglucagon-derived peptides in streptozotocin-induced diabetes*. Endocrinology 124:3003-9.

Bruttomesso D, Biolo G, Inchiostro S, Fongher C, Briani G, Duner E, Marescotti MC, Iori E, Tiengo A, Tessari P (1991) *No effects of high-fiber diets on metabolic control and insulin-sensitivity in type 1 diabetic subjects*. Diabetes Res Clin Pract 13:15-21.

Buteau J, Foisy S, Joly E, Prentki M (2003). *Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor*. Diabetes 52:124-32.

Calvo JC, Gisolfi CV, Blázquez E, Mora F (1995) *Glucagon-like peptide-1(7-36)amide induces the release of aspartic acid and glutamine by the ventromedial hypothalamus of the conscious rat*. Brain Res. Bull. 38, 435-9.

Cameron-Smith D, Habito R, Barnett M, Collier GR (1997) *Dietary guar gum improves insulin sensitivity in streptozotocin-induced diabetic rats.* J Nutr 127:359-64.

Campillo JE (2004) *El mono obeso.* Critica (ed), Barcelona.

Cancelas J, García-Martínez JA, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ (1999) *Synergistic insulinotropic action of D-glucose pentaacetate and GLP-1 in rats.* Med Sci Res 27:853-6.

Cani PD, Knauf C, Iglesias MA, Drucker DJ, Delzenne NM, Burcelin R (2006) *Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional GLP-1 receptor.* Diabetes 55:1484-90.

Creutzfeldt WO (2001) *The entero-insular axis in type 2 diabetes—cretins as therapeutic agents.* Exp Clin Endocrinol Diabetes 109(Suppl 2):S288-303.

Creutzfeldt WO y col. (1996) *Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients.* Diabetes Care 19:580-6.

D'Alessio DA, Prigeon RL, Ensinnck JW (1995) *Enteral enhancement of glucose disposition by both insulin-dependent and insulin-independent processes. A physiological role of glucagon-like peptide I.* Diabetes 44:1433-7.

D'Alessio DA, Kahn SE, Leusner CR, Ensinnck JW (1994) *Glucagon-like peptide 1 enhances glucose tolerance both by stimulation of insulin release and by increasing insulin-independent glucose disposal.* J Clin Invest May;93:2263-6.

Dardevet, Moore MC, Neal D, DiCostanzo CA, Snead W, Cherrington AD (2004) *Insulin-independent effects of GLP-1 on canine liver glucose metabolism: duration of infusion and involvement of hepatportal region.* Am J Physiol Endocrinol Metab 287:E75-81.

Deacon CF, Ahren B, Holst JJ (2004) *Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV: a novel approach for the prevention and treatment of Type 2 diabetes?* Expert Opin Investig Drugs 3:1091-102.

Deacon CF (2004a) *Circulation and degradation of GIP and GLP-1.* Horm Metab Res 36:761-5.

Deacon CF (2004b) *Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1.* Diabetes 53:2181-9.

Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ (1995) *Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects.* Diabetes 44:1126-31.

Degn KB, Brock B, Juhl CB, Djurhuus CB, Grubert J, Kim D, Han J, Taylor K, Fineman M, Schmitz O (2004) *Effect of intravenous infusion of exenatide (synthetic exendin-4) on glucose-dependent insulin secretion and counterregulation during hypoglycemia.* Diabetes 53:2397-403.

Degn, KB, Juhl CB, Sturis J, Jakobsen G, Brock B, Chandramouli V, Rungby J, Landau BR, Schmitz O (2004a) *One week's treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 derivative liraglutide (NN2211) markedly improves 24-h glycemia and alpha- and beta-cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes.* Diabetes 53:1187-94.

Delgado E, Luque MA, Alcantara A, Trapote MA, Clemente F, Galera C, Valverde I, Villanueva-Penacarrillo ML (1995) *Glucagon-like peptide-1 binding to rat skeletal muscle.* Peptides 16:225-9.

Demonty I, Deshaies Y, Lamarche B, Jacques H (2003) *Cod protein lowers the hepatic triglyceride secretion rate in rats.* J Nutr 133:1398-402.

Dhillon WS, Bloom SR (2004) *Gastrointestinal hormones and regulation of food intake.* Horm Metab Res 36:846-51.

Dollet JM, Beck B, Max JP, Debry G (1987) *Protein-energy malnutrition in pregnant rats improves the adaptation of the endocrine pancreas in malnourished offspring and induces insulin resistance after rehabilitation.* Br J Nutr 58:415-25.

Drucker DJ (2003) *Enhancing incretin action for the treatment of Type 2 Diabetes.* Diabetes Care 26:2929-40.

Drucker DJ (2003) *Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis.* Mol Endocrinol 17:161-71.

Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF (1987) *Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line.* Proc Natl Acad Sci USA 84:3434-8.

Ebeling P, Yki-Jarvinen H, Aro A, Helve E, Sinisalo M, Koivisto VA (1988) *Glucose and lipid metabolism and insulin sensitivity in type 1 diabetes: the effect of guar gum.* Am J Clin Nutr 48:98-103.

Egan JM, Meneilly GS, Habener JF, Elahi D (2002) *Glucagon-like peptide-1 augments insulin-mediated glucose uptake in the obese state.* J Clin Endocrinol Metab 87:3768-73.

Elliott, RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V (1993) *Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandium and 24-h secretion patterns.* J Endocrinol 138:159-66.

Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Arai Y (1964) *Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose administration.* J Clin Endocrinol Metab 24:1076-82.

Fairchild RM, Ellis PR, Byrne AJ, Luzio SD, Mir MA (1996) *A new breakfast cereal containing guar gum reduces post-prandium plasma glucose and insulin concentrations in normal-weight human subjects.* Br J Nutr 76:63-73.

Faulkner A, Pollock HT (1991) *Effects of truncated glucagon-like peptide-1 on the responses of starved sheep to glucose.* J Endocrinol 129:55-8.

Fehmann HC, Habener JF (1992) *Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells.* Endocrinology 130:159-66.

Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ (1998) *Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans.* J Clin Invest 101:515-20.

Gallwitz B (2005) *Glucagon-like peptide-1-based therapies for the treatment of type 2 diabetes mellitus* Treat Endocrinol 4:361-70.

Garcia-Martinez JA, Cancelas J, Villanueva-Penacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ (2000) *Potential of the insulinotropic action of GLP-1 by succinic acid dimethyl ester in fed anaesthetized rats.* Horm Metab Res 32:306-9.

Garcia-Martinez JA, Cancelas J, Villanueva-Penacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ (2000a) *Prolongation of the insulinotropic action of glucagon-like peptide 1 by the dimethyl ester of succinic acid in an animal model of type-2 diabetes.* Int J Mol Med 6:319-21.

García-Martínez JA, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Bjorkling F, Malaisse WJ (1997). *Stimulation of insulin release and potentiation of the insulinotropic action of antidiabetic agents by 1,2,3-tri(methylsuccinyl)glycerol ester in anaesthetized rats.* Pharmacol Res 36:369-72.

Garg A (1998) *High-monounsaturated-fat diets for patients with diabetes mellitus: a meta-analysis.* Am J Clin Nutr 67(Suppl 3): S 577-82.

Garg A (1996) *Insulin resistance in the pathogenesis of dyslipidemia.* Diabetes Care 19:387-9.

Garg A, Bantle JP, Henry RR, Coulston AM, Griver KA, Ratz SK, Brinkley L, Chen YD, Grundy SM, Huet BA (1994) *Effects of varying carbohydrate content of diet in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.* J Am Med Assoc 271:1421-8.

Garg A (1994a) *High monounsaturated fat diet for diabetic patients.* Diabetes Care 17:242-246.

Gerhard GT, Ahmann A, Meeuws K, McMurry MP, Duell PB, Connor WE (2004) *Effects of a low-fat diet compared with those of a high-monounsaturated fat diet on body weight, plasma lipids and lipoproteins, and glycemic control in type 2 diabetes.* Am J Clin Nutr 80:668-73.

Göke R, Wagner B, Fehmann HC, Goke B (1993) *Glucose-dependency of the insulin stimulatory effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on the rat pancreas.* Res Exp Med (Berl) 193:97-103.

Greenwood FC, Hunter WH, Glover JS (1963) *The preparation of iodine-131-labelled human growth hormone of high specific activity.* Biochem J 89:114-23.

Greig, NH, Mattson MP, Perry T, Chan SL, Giordano T, Sambamurti K, Rogers JT, Ovadia H, Lahiri DK (2004) *New therapeutic strategies and drug candidates for*

neurodegenerative diseases: p53 and TNF- α Inhibitors, and GLP-1 receptor agonists. Ann N Y Acad Sci 1035:290-315.

Groop LC, Ferrannini E (1993) *Insulin action and substrate competition.* Baillieres Clin Endocrinol Metab 7:1007-32.

Groop PH, Aro A, Stenman S, Groop L (1993a) *Long-term effects of guar gum in subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus.* Am J Clin Nutr 58:513-8.

Gunnarsson PT, Winzell MS, Deacon CF, Larsen MO, Jelic K, Carr RD, Ahren B (2006) *Glucose-induced incretin hormone release and inactivation are differently modulated by oral fat and protein in mice.* Endocrinology 147:3173-80.

Gutniak M, Ørskov C, Holst JJ, Ahren B, Effendic S (1992) *Antidiabetogenic effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus.* New Engl J Med 326:1316-22.

Herbert V, Lau KS, Gottlieb CW, Beicher SJ (1965) *Coated charcoal immunoassay of insulin.* J Clin Endocrinol Metab 25:1375-84.

Holst JJ (2004) *Treatment of type 2 diabetes mellitus with agonists of the GLP-1 receptor or DPP-IV inhibitors.* Expert Opin Emerg Drugs 9:155-66.

Holst JJ, Ørskov C, Nielsen OV, Schwartz TW (1987) *Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut.* FEBS Lett 211:169-74.

Holz GG, Chepurny OG (2003) *Glucagon-like peptide-1 synthetic analogs: new therapeutic agents for use in the treatment of diabetes mellitus.* Curr Med Chem 10:2471-83.

Hoyt EC, Lund PK, Winesett DE, Fuller CR, Ghatei MA, Bloom SR, Ulshen MH (1996) *Effects of fasting, refeeding, and intraluminal triglyceride on proglucagon expression in jejunum and ileum.* Diabetes 45:434-9.

Iridis I, Patiag D, Gray S, Donnelly R (2002) *Exendin-4 increases insulin sensitivity via a PI-3-kinase-dependent mechanism: contrasting effects of GLP-1.* Biochem Pharmacol 63:993-6.

Iritani N, Sugimoto T, Fukuda H, Komiya M, Ikeda H (1999) *Oral triacylglycerols regulate plasma glucagon-like peptide-1(7-36) and insulin levels in normal and especially in obese rats.* J Nutr 129:46-50.

Jackson RL, Shuey EW, Grinnan EL, Ellis RM (1969) *Preparation and partial characterization of crystalline human insulin.* Diabetes 18:206-11.

Joseph JW, Kalitsky J, St-Pierre S, Brubaker PL (2000) *Oral delivery of glucagon-like peptide 1 in a modified polymer preparation normalizes basal glycaemia in diabetic db/db mice.* Diabetologia 43:1319-28.

Juhl CB, Sturis J, Hollingdal M, Schmitz O (2005) *Acute insulin responses to intravenous glucose and GLP-1 are independent of preceding high-frequency insulin*

pulse-defects induced by glucose entrainment in healthy humans. Horm Metab Res 37:40-4.

Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE (1967) *Studies of the diabetogenic action of streptozotocin.* Proc Soc Exp Biol Med 126:201-5.

Kieffer TJ, McIntosh CHS, Pederson RA (1995) *Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV.* Endocrinology 136:3585-96.

Kirsten R, Nelson K, Storck J, Hubner-Steiner U, Speck U (1991) *Influence of two guar preparations on glucose and insulin levels during a glucose tolerance test in healthy volunteers.* Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol 29:19-22.

Knapper JM, Heath A, Fletcher JM, Morgan LM, Marks V (1995) *GIP and GLP-1(7-36)amide secretion in response to intraduodenal infusions of nutrients in pigs.* Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 111:445-50.

Komatsu R, Matsuyama T, Namba M, Watanabe N, Itoh H, Kono N, Tarui S (1989) *Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide 1-(7-36)-amide.* Diabetes 38:902-5.

Kok NN, Morgan LM, Williams CM, Roberfroid MB, Thissen JP, Delzenne NM (1998) *Insulin, glucagon-like peptide 1, glucose-dependent insulinotropic polypeptide and insulin-like growth factor I as putative mediators of the hypolipidemic effect of oligofructose in rats.* J Nutr 128:1099-103.

Kong MF, Chapman I, Goble E, Wishart J, Wittert G, Morris H, Horowitz M (1999) *Effects of oral fructose and glucose on plasma GLP-1 and appetite in normal subjects.* Peptides 20:545-51.

Kreymann B, Yiangou Y, Kanse S, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR (1998) *Isolation and characterisation of GLP-1 7-36 amide from rat intestine. Elevated levels in diabetic rats.* FEBS Lett 242:167-70.

Kreymann B, Ghatei MA, Williams G, Bloom SR (1987) *Glucagon-like peptide 1 7-36: a physiological incretin in man.* Lancet 2:1300-3.

Ladriere L, Zhang TM, Malaisse WJ (1996) *Effects of succinic acid dimethyl ester infusion on metabolic, hormonal, and enzymatic variables in starved rats.* J Parenter Enteral Nutr 20:251-6.

Lafrance L, Rabasa-Lhoret R, Poisson D, Ducros F, Chiasson JL (1998) *Effects of different glycaemic index foods and dietary fibre intake on glycaemic control in type 1 diabetic patients on intensive insulin therapy.* Diabet Med 15:972-8.

Landin K, Holm G, Tengborn L, Smith U (1992) *Guar gum improves insulin sensitivity, blood lipids, blood pressure, and fibrinolysis in healthy men.* Am J Clin Nutr 56:1061-5.

Lankat-Buttgereit B, Göke R, Fehmman HC, Richter G, Göke B (1994). *Molecular cloning of a cDNA encoding for the GLP-1 receptor expressed in rat lung*. Exp. Clin. Endocrinol 102:341-7.

Leech CA, Habener JF (2003) *Regulation of glucagon-like peptide 1 receptor and calcium-sensing receptor signaling by L-histidine*. Endocrinology 144:4851-8.

Lejeune MP, Westerterp KR, Adam TC, Luscombe-Marsh ND, Westerterp-Plantenga MS (2006) *Ghrelin and glucagon-like peptide 1 concentrations, 24-h satiety, and energy and substrate metabolism during a high-protein diet and measured in a respiration chamber*. Am J Clin Nutr 83:89-94.

LeRoith D (2002) *Beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities*. Am J Med 113(Suppl 6A):S3-11.

López LC, Frazier ML, Su CJ, Kumar A, Saunders GF (1983) *Mammalian pancreatic proglucagon contains three glucagon-related peptides*. Proc Natl Acad Sci USA 80:5485-9.

Low CC, Grossman EB, Gumbiner B (1996) *Potentiation of effects of weight loss by monounsaturated fatty acids in obese NIDDM patients*. Diabetes 45:569-75.

Lowry OH (1972) *A flexible system of enzymatic analysis*. Acad Press (ed.) New York.

Lugari R, Dell'Anna C, Ugolotti D, Dei Cas A, Barilli AL, Zandomenighi R, Marani B, Iotti M, Orlandini A, Gnudi A (2000) *Effect of nutrient ingestion on glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) secretion in human type 1 and type 2 diabetes*. Horm Metab Res 32:424-8.

Luque MA, González N, Márquez L, Acitores A, Redondo A, Morales M, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2002) *Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose metabolism in human myocytes*. J Endocrinol 173:465-73.

Lütticken (1993) *A method for extracting and measuring proglucagon-derived peptides*. J Clin Endocrinol Metab 77:1654-7.

Malaisse WJ (2002) *Metabolic interactions between glucose and fructose*. Bull Mem Acad R Med Belg 157:349-52; discussion 352-3.

Malaisse WJ, Ladriere L, Verbruggen I, Willem R (2002) *Metabolism of D-[1-(13)C]fructose, D-[2-(13)C]fructose, and D-[6-(13)C]fructose in rat hepatocytes incubated in the presence of H₂O or D₂O*. Mol Genet Metab 75:162-7.

Malaisse WJ, Ladriere L, Verbruggen I, Willem R (2002a) *Effects of D-glucose upon D-fructose metabolism in rat hepatocytes: A ¹³C NMR study*. Mol Cell Biochem 241:103-6.

Malaisse WJ (1999) *Mechanism of action of a new class of insulin secretagogues*. Exp Clin Endocrinol Diabetes 107:S140-3.

Malaisse WJ (1999a) *Insulinotropic action of monosaccharide esters: therapeutic perspectives*. Diabetologia 42:286-91.

Malaisse WJ (1998) *Monosaccharide esters: new tools in biomedical research*. Mol. Genet. Metab. 65:129-42.

Malaisse WJ (1997) *Insulin biosynthesis and secretion in vitro* En: International Textbook of Diabetes Mellitus. K.G.M.M. Alberti, P. Zimmet, R.A. De Fronzo, H. Keen (eds.). John Wiley & Sons, Chichester. Pp. 315-35.

Malaisse WJ (1993) **.

Malaisse WJ, Malaisse-Lagne F, Davies DR, Vandercampen A, Van Schaftigen E (1990) *Regulation of glucokinase by a fructose-1-phosphate-sensitive protein in pancreatic islets*. Eur J Biochem 190:539-45.

Malaisse WJ (1973) *Insulin secretion: multifactorial regulation for a single process of release*. Diabetologia 9:167-73.

Marquez L, Gonzalez N, Puente J, Valverde L, Villanueva-Penacarrillo ML (2001) *GLP-1 effect upon the GPI/IPG system in adipocytes and hepatocytes from diabetic rats*. Diabetes Nutr Metab 14:239-44.

Marquez L, Trapote MA, Luque MA, Valverde I, Villanueva-Penacarrillo ML (1998) *Inositolphosphoglycans possibly mediate the effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat liver and adipose tissue*. Cell Biochem Funct 16:51-6.

Massimino SP, McBurney MI, Field CJ, Thomson AB, Keelan M, Hayek MG, Sunvold GD (1998) *Fermentable dietary fiber increases GLP-1 secretion and improves glucose homeostasis despite increased intestinal glucose transport capacity in healthy dogs*. J Nutr 128:1786-93.

McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS (1965) *Intestinal factors in the control of insulin secretion*. J Clin Endocrinol Metab 25:1317-24.

Meier JJ, Gethmann A, Nauck MA, Goetze O, Schmitz F, Deacon CF, Gallwitz B, Schmidt WE, Holst JJ (2006) *The glucagon-like peptide 1 metabolite GLP-1 (9-36)amide reduces post-prandium glycemia independently of gastric emptying and insulin secretion in humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab 290(6):E1118-23

Mentlein R (1999) *Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides*. Regul Pept 30;85:9-24.

Mérida E, Delgado E, Molina LM, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1993) *Presence of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36)amide receptors in solubilized membranes of human adipose tissue*. J Clin Endocrinol Metab 77:1654-7.

Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF (1986) *Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing*. J Biol Chem 261:11880-9.

Moore MC, Davis SN, Mann SL, Cherrington AD (2001) *Acute fructose administration improves oral glucose tolerance in adults with type 2 diabetes*. Diabetes Care 24:1882-7.

Mora F, Expósito I, Sanz B, Blázquez E (1992). *Selective release of glutamine and glutamic acid produced by perfusion of GLP-1(7-36)amide in the basal ganglia of the conscious rat.* Brain Res Bull 29:359-61.

Morales M, López-Delgado MI, Alcántara A, Luque MA, Clemente F, Márquez L, Puente J, Viñambres C, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1997) *Preserved effects upon glycogen synthase activity and glucose metabolism in isolated hepatocytes and skeletal muscle from diabetic rats.* Diabetes 46:1264-9.

Morgan LM, Tredger JA, Wright J, Marks V (1990) *The effect of soluble- and insoluble-fibre supplementation on post-prandium glucose tolerance, insulin and gastric inhibitory polypeptide secretion in healthy subjects.* Br J Nutr 64:103-10.

Moukil MA, Van Shaftingen E (2001) *Analysis of the cooperativity of human beta-cell glucokinase through the stimulatory effect of glucose on fructose phosphorylation.* J Biol Chem 276:3872-8.

Naslund E, King N, Mansten S, Adner N, Holst JJ, Gutniak M, Hellstrom PM (2004) *Prandial subcutaneous injections of glucagon-like peptide-1 cause weight loss in obese human subjects.* Br J Nutr 91:439-46.

Nathan DM, Schreiber E, Fogel H, Mojsov S, Habener JF (1992) *Insulinotropic action of glucagonlike peptide-1-(7-37) in diabetic and nondiabetic subjects.* Diabetes Care 15:270-6.

Nauck MA (1998) *Glucagon-like peptide (GLP-i): a potent gut hormone with a possible therapeutic perspective.* Acta Diabetol 35:117-29.

Nauck M, Heimesaat MM, Ørskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. (1993). *Preserved incretin activity of glucagon-like peptide-1 (7-36 amide), but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus.* J Clin Invest 91:301-7.

Navarro M, Rodríguez de Fonseca F, Alvarez E, Chowen JA, Zueco JA, Gómez R, Eng J, Blázquez E. (1996). *Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake.* J Neurochem 67:1982-91.

Newman JE, Hargreaves M, Garnham A, Snow RJ (2003) *Effect of creatine ingestion on glucose tolerance and insulin sensitivity in men.* Med Sci Sports Exerc 35:69-74.

Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, Miske G, Shah A, Elahi D, Shannon RP (2004) *Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion.* Circulation 2;109:962-5.

Novak U, Wilks A, Buell G, McEwen S (1987) *Identical mRNA for preproglucagon in pancreas and gut.* Eur J Biochem 164:553-8.

Oberfield SE (2000) *Metabolic lessons from the study of young adolescents with polycystic ovary syndrome —is insulin, indeed, the culprit?* J Clin Endocrinol Metab 85:3520-5.

O'Halloran DJ, Nikou GC, Kreymann B, Ghatel MA, Bloom SR (1990) *Glucagon-like peptide-1 (7-36)-NH₂: a physiological inhibitor of gastric acid secretion in man.* J Endocrinol 126:169-73.

Ørskov C, Jeppesen J, Madsbad S, Holst JJ (1991) *Proglucagon products in plasma of noninsulin-dependent diabetics and nondiabetic controls in the fasting state and after oral glucose and intravenous arginine.* J Clin Invest 87:415-23.

Ørskov C, Bersani M, Johnsen AH, Hojrup P, Holst JJ (1989) *Complete sequences of glucagon-like peptide-1 from human and pig small intestine.* J Biol Chem 264:12826-9.

Ørskov C, Holst JJ, Nielsen OV (1988) *Effect of truncated glucagon-like peptide 1 (proglucagon 78-107 amide) on endocrine secretion from pig pancreas, antrum and stomach.* Endocrinology 123:2009-13.

Ørskov C, Holst JJ (1987) *Radioimmunoassays for glucagon-like peptides 1 and 2.* Scand J Clin Lab Invest 47:165-74.

Ørskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FG, Poulsen SS, Nielsen OV (1986) *Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas.* Endocrinology 119:1467-75.

Parrillo M, Rivellese AA, Ciardullo B, Giasso A, Genovese S, Ricardo G (1992) *A high-monounsaturated-fat/low-carbohydrate diet improves peripheral insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic patients.* Metabolism 41:1373-8.

Patzelt C, Schiltz E (1984) *Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences.* Proc Natl Acad Sci USA 81:5007-11.

Perea A, Viñambres C, Clemente F, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1997) *GLP-1(7-36)amide effects on glucose transport and metabolism in rat adipose tissue.* Horm Metab Res 29:417-21.

Perry T, Greig NH (2005) *Enhancing central nervous system endogenous GLP-1 receptor pathways for intervention in Alzheimer's disease.* Curr Alzheimer Res 2:377-85.

Petersen KF, Laurent D, Yu C, Cline GW, Shulman GI (2001) *Stimulating effects of low-dose fructose on insulin-stimulated hepatic glycogen synthesis in humans.* Diabetes 50:1263-8.

Pohl M, Mayr P, Mertl-Roetzer M, Lauster F, Lerch M, Eriksen J, Haslbeck M, Rahlfs VW (2005) *Glycaemic control in type II diabetic tube-fed patients with a new*

enteral formula low in carbohydrates and high in monounsaturated fatty acids: a randomised controlled trial. Eur J Clin Nutr 59:1221-32.

Portha B, Picon L, Rosselin G (1979) *Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes.* Diabetologia 17:371-7.

Prieto P, Cancelas J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ (2003) *Sensitivity of an oral test for detection of the insulinotropic action of exogenous nutrients: experiments with L-leucine.* Diabetes Res 37:23-27.

Qualmann C, Nauck MA, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W (1995) *Insulinotropic actions of intravenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1) [7-36 amide] in the fasting state in healthy subjects.* Acta Diabetol 32:13-6.

Rask E, Olsson T, Soderberg S, Johnson O, Seckl J, Holst JJ, Ahren B (2001) *Impaired incretin response after a mixed meal is associated with insulin resistance in nondiabetic men.* Diabetes Care 24:1640-5.

Reaven GM (1988) *Role of insulin resistance in human disease.* Banting lecture. Diabetes 37:1595-607.

Reimann F, Williams L, da Silva Xavier G, Rutter GA, Gribble FM (2004) *Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells.* Diabetologia 47:1592-601.

Reimer RA, Darimont C, Gremlich S, Nicolas-Metral V, Ruegg UT, Mace K (2001) *A human cellular model for studying the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion.* Endocrinology 142:4522-8.

Reimer RA, Thomson AB, Rajotte RV, Basu TK, Ooraikul B, McBurney MI (1997) *A physiological level of rhubarb fiber increases proglucagon gene expression and modulates intestinal glucose uptake in rats.* J Nutr 127:1923-8.

Reimer RA, McBurney MI (1996) *Dietary fiber modulates intestinal proglucagon messenger ribonucleic acid and post-prandium secretion of glucagon-like peptide-1 and insulin in rats.* Endocrinology 137:3948-56.

Riccardi G, Parrillo M (1993) *Comparison of the metabolic effects of fat-modified vs low fat diets.* Ann NY Acad Sci 683:192-8.

Riccardi G, Rivellese AA (2000) *Dietary treatment of the metabolic syndrome –the optimal diet.* Br J Nutr 83:S143-8.

Rocca AS, La Greca J, Kalitsky J, Brubaker PL (2001) *Monounsaturated fatty acid diets improve glycaemic tolerance through increased secretion of glucagon-like peptide 1.* Endocrinology 142:1148-55.

Rocca AS, Brubaker PL (1995) *Stereospecific effects of fatty acids on proglucagon-derived peptide secretion in fetal rat intestinal cultures.* Endocrinology 136:5593-9.

Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Álvarez E, Roncero I, Chown JA, Maestre O, Gómez R, Muñoz RM, Eng I, Blázquez E (2000) *Peripheral versus central effects of*

glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. Metabolism 49:709-17.

Rooney KB, Bryson JM, Digney AL, Rae CD, Thompson CH (2003) *Creatine supplementation affects glucose homeostasis but not insulin secretion in humans.* Ann Nutr Metab 47:11-5.

Rooney K, Bryson J, Phuyal J, Denyer G, Caterson I, Thompson C (2002) *Creatine supplementation alters insulin secretion and glucose homeostasis in vivo.* Metabolism 51:518-22.

Ruiz-Grande C, Alarcón C, Mérida E, Valverde I (1992) *Lipolytic action of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes.* Peptides 13:13-6.

Russo A, Stevens JE, Wilson T, Wells F, Tonkin A, Horowitz M, Jones KL (2003) *Guar attenuates fall in post-prandium blood pressure and slows gastric emptying of oral glucose in type 2 diabetes.* Dig Dis Sci 48:1221-9.

Sancho V, Trigo MV, Martin-Duce A, Gonz Lez N, Acitores A, Arnes L, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Penacarrillo ML (2006) *Effect of GLP-1 on D-glucose transport, lipolysis and lipogenesis in adipocytes of obese subjects.* Int J Mol Med 17:1133-7.

Shiota M, Moore MC, Galassetti P, Monohan M, Neal DW, Shulman GI, Cherrington AD (2002) *Inclusion of low amounts of fructose with an intraduodenal glucose load markedly reduces post-prandium hyperglycaemia and hyperinsulinemia in the conscious dog.* Diabetes 51:469-78.

Schjoldager BT, Mortensen PE, Christiansen J, Orskov C, Holst JJ (1989) *GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans.* Dig Dis Sci 34:703-8.

Schuster DP, Duvuuri V (2002) *Diabetes mellitus.* Clin Pediatr Med Surg 19:79-107.

Scruel O, Sener A, Malaisse WJ (1997) *Glucose-induced positive cooperativity of fructose phosphorylation by human B-cell glucokinase.* Mol Cell Biochem 175:263-9.

SED, Sociedad Española de Diabetes (2005) *Documento 2005 de consenso entre varias sociedades científicas sobre pautas de manejo del paciente diabético tipo 2 en España.* Avances en Diabetología 21.

Shima K, Hirota M, Ohboshi C (1988) *Effect of glucagon-like peptide-1 on insulin secretion.* Regul Pept 22:245-52.

Siegel EG, Schulze A, Schmidt WE, Creutzfeldt W (1992) *Comparison of the effect of GIP and GLP-1 (7-36amide) on insulin release from rat pancreatic islets.* Eur J Clin Invest 22:154-7.

Sierra M, Garcia JJ, Fernandez N, Diez MJ, Calle AP, Sahagun AM (2001) *Effects of ispaghula husk and guar gum on post-prandium glucose and insulin concentrations in healthy subjects.* Eur J Clin Nutr 55:235-43.

Slama G (2001) *The diabetic at the table: pariah or model?* Bull Mem Acad R Med Belg 156:124-36

Sievenpiper JL, Vuksan V, Wong EY, Mendelson RA, Bruce-Thompson C (1998) *Effect of meal dilution on the post-prandium glycemic response. Implications for glycemic testing.* Diabetes Care 21:711-6.

Sloop KW, Cao JX, Siesky AM, Zhang HY, Bodenmiller DM, Cox AL, Jacobs SJ, Moyers JS, Owens RA, Showalter AD, Brenner MB, Raap A, Gromada J, Berridge BR, Monteith DK, Porksen N, McKay RA, Monia BP, Bhanot S, Watts LM, Michael MD (2004) *Hepatic and glucagon-like peptide-1-mediated reversal of diabetes by glucagón receptor antisense oligonucleotide inhibitors.* J Clin Invest 113:1571-81.

Srinivasan M, Aalinkeel R, Song F, Lee B, Laychock SG, Patel MS (2000) *Adaptive changes in insulin secretion by islets from neonatal rats raised on a high-carbohydrate formula.* Am J Physiol Endocrinol Metab 279:E1347-57.

Stralfors P (1997) *Insulin second messengers.* Bioessays 19:327-35.

Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW (2005) *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy.* Lancet 365:1333-46.

Suzuki T, Hara H (2004) *Ingestion of guar gum hydrolysate, a soluble and fermentable nondigestible saccharide, improves glucose intolerance and prevents hypertriglyceridemia in rats fed fructose.* J Nutr 134:1942-7.

Tappenden KA, McBurney MI (1998) *Systemic short-chain fatty acids rapidly alter gastrointestinal structure, function, and expression of early response genes.* Dig Dis Sci 43:1526-36.

Thim L, Moody AJ (1982) *Purification and chemical characterization of a glicentin-related pancreatic peptide (proglucagon fragment) from porcine pancreas.* Biochim Biophys Acta 703:134-41.

Thim L, Moody AJ (1981) *The primary structure of porcine glicentin (proglucagon).* Regul Pept 2:139-50.

Thomsen C, Storm H, Holst JJ, Hermansen K (2003) *Differential effects of saturated and monounsaturated fats on post-prandium lipemia and glucagon-like peptide 1 responses in patients with type 2 diabetes.* Am J Clin Nutr 77:605-11.

Thomsen C, Rasmussen O, Lousen T, Holst JJ, Fenselau S, Schrezenmeir J, Hermansen K (1999) *Differential effects of saturated and monounsaturated fats on post-prandium lipemia and incretin responses in healthy subjects.* Am J Clin Nutr 69:1135-43.

Thorens B, Wu YJ, Leahy JL, Weir GC (1992) *The loss of GLUT2 expression by glucose-unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment.* J Clin Invest 90:77-85.

Thorens B (1992a) *Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1.* Proc Natl Acad Sci USA 89:8641-5.

Thorens B (1992b) *Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-K_m facilitated diffusion glucose transporter*. *Int Rev Cytol* 137:209-38.

Thum A, Hupe-Sodmann K, Goke R, Voigt K, Goke B, McGregor GP (2002) *Endoproteolysis by isolated membrane peptidases reveal metabolic stability of glucagon-like peptide-1 analogs, exendins-3 and -4*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 110:113-8.

Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK, Holst JJ (2001) *Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients*. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3717-23.

Tordottir I, Andersson H (1989) *Effect on the post-prandium glycaemic level of the addition of water to a meal ingested by healthy subjects and type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients*. *Diabetologia* 32:231-5.

Torsdottir I, Alpsten M, Andersson H, Einarsson S (1989a) *Dietary guar gum effects on post-prandium blood glucose, insulin and hydroxyproline in humans*. *J Nutr* 119:1925-31.

Trapote MA (1992) *Distribución y caracterización de péptidos derivados de la molécula de proglucagón, en el tracto gastrointestinal y en el páncreas* (Tesis Doctoral). Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca.

Turner NC, Clapham JC (1998) *Insulin resistance, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes, pathologic mechanisms and treatment: current status and therapeutic possibilities*. *Prog Drug Res* 51:33-94.

Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR (1996) *A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding*. *Nature* 379:69-72.

Uttenthal LO, Blázquez E (1990). *Characterization of high-affinity receptors for truncated glucagon-like peptide-1 in rat gastric glands*. *FEBS Lett* 262:139-41.

Vachon C, Jones JD, Wood PJ, Savoie L (1988) *Concentration effect of soluble dietary fibers on post-prandium glucose and insulin in the rat*. *Can J Physiol Pharmacol* 66:801-6.

Valverde I, Delgado E, Mérida E, Vicent D, Trapote MA, Alcántara AI, Villanueva-Peñacarrillo ML (1996) *GLP-1(7-36) amide binding in liver membranes from streptozotocin diabetic rats*. *Diab Nutr Metab* 9:103-5.

Valverde I, Morales M, Clemente F, López-Delgado MI, Delgado E, Perea A, Villanueva-Peñacarrillo ML (1994) *Glucagon-like peptide 1: a potent glycogenic hormone*. *FEBS Lett*. 349, 313-316.

Valverde I, Mérida E, Delgado E, Trapote MA, Villanueva-Peñacarrillo ML (1993) *Presence and characterization of glucagon-like peptide-1(7-36) amide receptors in solubilized membranes of rat adipose tissue*. *Endocrinology* 132:75-9.

- Valverde I, Barreto M, Malaisse WJ** (1988) *Stimulation by D-glucose of protein biosynthesis in tumoral insulin-producing cells (IRNm5F line)*. *Endocrinology* 122:1443-8.
- Van Schaffingen E** (1989) *A protein from rat liver confers glucokinase the property of being regulated by fructose-6-phosphate and fructose-1-phosphate*. *Eur J Biochem* 179:175-84.
- Verdich C, Toubro S, Buemann B, Lysgard Madsen J, Juul Holst J, Astrup A** (2001) *The role of post-prandium releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety--effect of obesity and weight reduction*. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1206-14.
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Puente J, Redondo A, Clemente F, Valverde I** (2001) *Effect of GLP-1 treatment on GLUT2 and GLUT4 expression in type 1 and type 2 rat diabetic models*. *Endocrine* 15:241-8.
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Marquez L, Gonzalez N, Diaz-Miguel M, Valverde I** (2001a) *Effect of GLP-1 on lipid metabolism in human adipocytes*. *Horm Metab Res* 33:73-7.
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Delgado E, Vicent D, Mérida E, Alcántara AI, Valverde I** (1995) *GLP-1(7-36)amide binding in skeletal muscle membranes from streptozotocin diabetic rats*. *Endocrine* 3:685-7.
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Delgado E, Trapote MA, Alcántara A, Clemente F, Luque MA, Perea A, Valverde I** (1995a) *Glucagon-like peptide-1 binding to rat hepatic membranes*. *J Endocrinol* 146:183-9.
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Mérida E, Delgado E, Molina LM, Arrieta F, Rovira A, Valverde I** (1994) *Increased glucagon-like peptide 1 (7-36) amide binding in adipose tissue from non-insulin dependent and insulin-dependent diabetic patients*. *Diab Nutr Metab* 7:143-8.
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Alcántara AI, Clemente F, Delgado E, Valverde I** (1994a) *Potent glycogenic effect of GLP-1(7-36)amide in rat skeletal muscle*. *Diabetologia* 37:1163-6.
- Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ** (2001) *Reduced post-prandium concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients*. *Diabetes* 50:609-13.
- Vinik AI, Jenkins DJ** (1988) *Dietary fiber in management of diabetes*. *Diabetes Care* 11:160-73.
- Virkkamaki A, Puhakainen I, Koivisto VA, Vuorinen-Markkola H, Yki-Jarvinen H** (1992) *Mechanisms of hepatic and peripheral insulin resistance during acute infections in humans*. *J Clin Endocrinol Metab* 74:673-9.

Vuorinen-Markkola H, Koivisto VA, Yki-Jarvinen H (1992) *Mechanisms of hyperglycemia-induced insulin resistance in whole body and skeletal muscle of type I diabetic patients.* Diabetes 41:571-80.

Vuorinen-Markkola H, Sinisalo M, Koivisto VA (1992a) *Guar gum in insulin-dependent diabetes: effects on glycemic control and serum lipoproteins.* Am J Clin Nutr 56:1056-60.

Wettergren A, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ (1993) *Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man.* Digest Dis Sci 38:665-73.

Wheeler MB, Lu M, Dillon JS, Leng WH, Chen CH, Boyd AE (1993) *Functional expression of the rat glucagon-like peptide-1 receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C.* Endocrinology 133:57-62.

Willms B, Werner J, Holst JJ, Ørskov C, Creutzfeldt W, Nauck MA (1996) *Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1-(7-36)amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients.* J Clin Endocrinol Metab 81:327-32.

Wright J (1998) *Effect of high-carbohydrate versus high-monounsaturated fatty acids diet on metabolic control in diabetes and hyperglycaemic patients.* Clin Nutr 17:35-45.

Yallow RS, Berson SA (1960) *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.* J Clin Invest 39:1157-75.

Yanaihara C, Matsumoto T, Hong YM, Yanaihara N (1985) *Isolation and chemical characterization of glicentin C-terminal hexapeptide in porcine pancreas.* FEBS Lett 189:50-6.

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| Δ | incremento, incremental |
| Δ área | área incremental |
| CoA | coenzima A |
| ApoB | apolipoproteína B |
| ARNm | ácido ribonucleico mensajero |
| ATP | adenosin trifosfato |
| BSA | albúmina sérica bovina |
| DHA | dihidroxiacetona |
| EDTA | ácido etilendinitrilotetraacético |
| EEM | error estándar de la media |
| Ex-4 | exendina 4 |
| F1P | fructosa-1-fosfato |
| F6P | fructosa-6-fosfato |
| G6PdH | glucosa-6-fosfato deshidrogenasa |
| GIP | polipéptido insulínico dependiente de glucosa |
| GLP | péptido similar al glucagón |
| GRPP | péptido pancreático relacionado con la glicentina |
| HPLC | cromatografía líquida de alta precisión |
| HSA | albúmina sérica humana |
| I/G | relación entre el Δ área de insulina y el Δ área de glucosa |
| IP | péptido intrínico |
| IR | resistencia a insulina |
| K | coeficiente de utilización de glucosa |
| LDL | lipoproteína de baja densidad |
| MPGF | fragmento de proglucagón mayor |
| MTP | proteína de transferencia de triglicéridos microsomales |
| MUFA | ácido graso monoinsaturado |
| M&M | material y métodos |
| P | fosfato |
| PG | proglucagón |
| Pm | peso molecular |
| PUFA | ácido graso poliinsaturado |
| r | coeficiente de correlación estadística |
| RIA | radioinmunoanálisis |
| STZ | Estreptozotocina |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| UAR | Unión Agrícola Regional |
| UIC | unidad inhibidora de calicreína |
| VLDL | Lipoproteína de muy baja densidad |

