

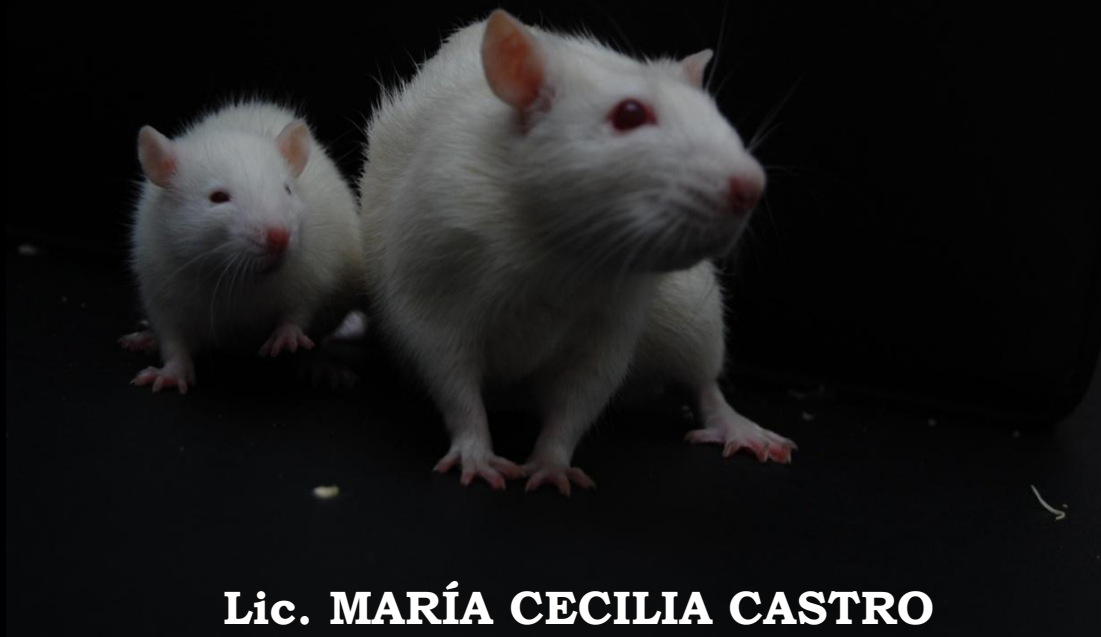


*UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA*

*FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS*

## **TRABAJO DE TESIS DOCTORAL**

**ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO EN RATAS CON  
INSULINORRESISTENCIA INDUCIDA POR DIETA RICA EN  
FRUCTOSA Y SU REMISIÓN POR ADMINISTRACIÓN DE  
ÁCIDO  $\alpha$  LIPOICO**



**Lic. MARÍA CECILIA CASTRO**

**Director: Prof. Dra. MARÍA LAURA MASSA**

**Codirector: Prof. Dr. FLAVIO FRANCINI**

**2012**



*UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA*

*FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS*

## **TRABAJO DE TESIS DOCTORAL**

**ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO EN RATAS CON  
INSULINORRESISTENCIA INDUCIDA POR DIETA RICA EN  
FRUCTOSA Y SU REMISIÓN POR ADMINISTRACIÓN DE  
ÁCIDO  $\alpha$  LIPOICO**

**Lic. MARÍA CECILIA CASTRO**

**Director: Prof. Dra. MARÍA LAURA MASSA**

**Codirector: Prof. Dr. FLAVIO FRANCINI**

**2012**

## *Agradecimientos*

*A mi mamá Anita, quien siempre me ha guiado en la vida, me ha enseñado a ser perseverante y luchadora; a quien admiro y adoro con toda mi alma,*

*A mi hermano Crisito por estar presente siempre, a pesar de los kilómetros que nos separan,*

*A Martín por ser mi compañero, por aceptarme tal cual soy y ser mi sostén en cada momento,*

*A Zoe y Jana, mis ratitas preferidas, y a tantas otras sin las cuales no habría podido realizar este trabajo,*

*Al Dr. Juan José Gagliardino, por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo de tesis en el Instituto,*

*A mis queridos directores Laura y Flavio, por acompañarme durante este proceso de aprendizaje, por su apoyo, su paciencia y afecto,*

*A Adrián, por su compañía y largas charlas en el laboratorio,*

*A Guillermo y Luisa, por su colaboración en distintas mediciones,*

*A Adriana, por la revisión minuciosa del manuscrito,*

*A mis compañeros del CENEXA, quienes han colaborado en mayor o menor medida en la realización de este trabajo,*

*Al CONICET por el soporte económico aportado mediante las distintas becas y el subsidio asignado a la Dra. María Laura Massa (PIP 0371) que contribuyeron a la realización de este trabajo.*

## **ABREVIATURAS**

**ACC:** acetil-CoA carboxilasa

**Acetil-CoA:** acetil coenzima A

**ACGL:** ácidos grasos libres

**ADNc:** ADN complementario

**AL:** ácido lipoico

**ALT:** alanina aminotransferasa

**AST:** aspartato aminotransferasa

**AMPK:** proteína quinasa activada por AMP

**C:** grupo control

**ChREBP:** proteína de unión a elementos reguladores de carbohidratos (del inglés *carbohydrate regulatory element-binding protein*)

**CK:** ciclo de Krebs

**CL:** control + ácido lipoico

**COX2:** ciclooxigenasa 2

**CPT-1:** carnitina-palmitoiltransferasa 1

**DAB:** diaminobenzidina

**DHA-P:** dihidroxiacetona-fosfato

**DMT2:** diabetes mellitus tipo 2

**DNPH:** 2,4-dinitrofenilhidrazina

**DRF:** dieta rica en fructosa

**ECL:** electroquimioluminiscencia

**EO:** estrés oxidativo

**F:** grupo tratado con fructosa

**F-1-P:** fructosa-1-fosfato

**FAS:** sintasa de ácidos grasos (del inglés *fatty acid synthase*)

**FL:** grupo tratado con fructosa + ácido lipoico

**FO:** fosforilación oxidativa

**FQ:** fructoquinasa

**G-3-P:** gliceraldehído-3-fosfato

**Gl-6-Pasa:** glucosa-6-fosfatasa

**Gl-6-PDH:** glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

**GLUT:** transportador de glucosa (del inglés *glucose transporter*)

**GPAT:** glicerol-fosfato-acil-transferasa

**GPx:** glutatión peroxidasa

**GQ:** glucoquinasa

**GR:** glutatión reductasa

**GSH:** glutatión reducido

**GSSG:** glutatión oxidado

**HOMA-IR:** modelo de determinación homeostático de insulinoresistencia  
(del inglés *homeostatic model assessment-insulin resistance*)

**IL:** interleuquina

**IR:** insulinoresistencia

**IRS:** sustrato del receptor de insulina (del inglés *insulin receptor substrate*)

**ISHI:** índice de sensibilidad hepática a la insulina

**LASY:** ácido lipoico sintetasa

**LDH:** lactato deshidrogenasa

**MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos

**MDH:** malato deshidrogenasa

**NAFLD:** esteatohepatitis no alcohólica (del inglés *non-alcoholic fatty liver disease*)

**NEFA:** ácidos grasos no esterificados (del inglés *non-esterified fatty acids*)

**NFκβ:** factor nuclear kappa-B (del inglés *nuclear factor kappa-B*)

**PAI-1:** inhibidor del activador del plasminógeno-1 (del inglés *plasminogen activator inhibitor-1*)

**PDH:** piruvato deshidrogenasa

**PEPCK:** fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

**PFK:** fosfofructoquinasa (del inglés *phosphofructo-kinase*)

**PI3K:** fosfatidilinositol-3-quinasa

**PK:** piruvato quinasa

**PPAR:** receptor de peroxisomas activado por proliferación (del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor*)

**PTP1B:** proteína tirosina fosfatasa 1B

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés *quantitative polymerase chain reaction*)

**RI:** receptor de insulina

**ROS:** especies reactivas del oxígeno (del inglés *reactive oxygen species*)

**SOD:** superóxido dismutasa

**SREBP 1c:** proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1c (del inglés *sterol regulatory element-binding protein 1c*)

**TBARS:** sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

**TCA:** ácido tricloroacético

**TG:** triglicéridos

**TGA:** tolerancia a la glucosa alterada

**TLR:** receptor tipo Toll (del inglés *Toll-like receptor*)

**TNF $\alpha$** : factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (del inglés *tumoral necrosis factor  $\alpha$* )

**UCP2**: proteína desacoplante mitocondrial 2 (del inglés *uncoupling protein mitochondrial 2*)

# ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Diabetes y pre-diabetes.....	2
1.2. Condicionantes genéticos y ambientales.....	3
1.3. Alimentación no saludable: dietas ricas en fructosa.....	5
1.4. Metabolismo de la fructosa en el hígado.....	7
1.5. Mecanismos moleculares de la IR y su relación con el consumo de fructosa.....	14
1.6. Diabetes e inflamación.....	17
1.7. Estrés oxidativo y dieta rica en fructosa.....	20
1.8. Ácido lipoico y dieta rica en fructosa.....	24
1.9. Hipótesis de trabajo y objetivos.....	29
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1. Reactivos empleados.....	32
2.2. Grupos experimentales.....	33
2.3. Determinación de parámetros séricos.....	34
2.4. Curva de tolerancia oral a la glucosa.....	37
2.5. Expresión génica mediante PCR en tiempo real (qPCR).....	37
2.6. Expresión proteica mediante Western blot.....	42
2.7. Actividades enzimáticas.....	46
2.7.1. Actividad de SOD.....	46
2.7.2. Actividad de catalasa.....	48
2.7.3. Actividad de GQ.....	48
2.7.4. Actividad de Gl-6-Pasa.....	49
2.7.5. Actividad de Gl-6-PDH.....	50
2.7.6. Actividad de FQ.....	51



2.8. Otras mediciones.....	51
2.8.1. TBARS en hígado.....	51
2.8.2. Estimación del contenido de GSH hepático.....	52
2.8.3. Proteínas carboniladas.....	52
2.8.4. Capacidad antioxidante mediante ensayo ABTS..	53
2.8.5. Determinación de glucógeno hepático.....	53
2.8.6. Evaluación histológica del contenido de TG hepáticos.....	54
2.9. Análisis estadístico de datos.....	54

### 3. RESULTADOS

3.1. Seguimiento de los animales en tratamiento y determinación de parámetros séricos.....	56
3.1.1. Ingesta de comida y bebida. Ganancia de peso corporal al final del tratamiento.....	56
3.1.2. Determinación de parámetros séricos.....	57
3.1.3. Curva de tolerancia oral a la glucosa.....	58
3.2. Marcadores de estrés oxidativo.....	59
3.2.1. Contenido hepático de GSH, proteínas carboniladas y TBARS.....	59
3.2.2. Expresión génica y proteica de SOD1, SOD2, catalasa y GR.....	60
3.2.3. Actividad enzimática de catalasa y SOD.....	61
3.2.4. Capacidad antioxidante mediante ensayo ABTS..	62
3.3. UCP2, PPARs y NAD(P)H oxidasa.....	63
3.3.1. Expresión génica y proteica de UCP2 y PPARs...	63
3.3.2. Expresión génica y proteica de NAD(P)H oxidasa.....	65
3.4. Marcadores de inflamación.....	66
3.4.1. Expresión génica de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , NF $\kappa$ $\beta$ y PAI-1.....	66

3.4.2. Expresión proteica de TNF $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ y COX2.....	67
3.5. Metabolismo de carbohidratos.....	68
3.5.1. Expresión génica de Gl-6-Pasa, Gl-6-PDH, GQ y PFK-2.....	69
3.5.2. Actividad enzimática de Gl-6-Pasa y Gl-6-PDH..	69
3.5.3. Expresión proteica de GQ y PFK-2.....	70
3.5.4. Actividad enzimática de GQ en las fracciones citosólica y nuclear.....	71
3.5.5. Expresión génica de PEPCK y PK.....	72
3.5.6. Expresión génica, proteica y actividad enzimática de FQ.....	73
3.5.7. Contenido hepático de glucógeno.....	74
3.6. Metabolismo de lípidos.....	75
3.6.1. Expresión génica de ChREBP, SREBP 1c, CPT-1, FAS y GPAT.....	75
3.6.2. Contenido hepático de triglicéridos mediante histología.....	77
3.7. Expresión génica de LASY.....	77
3.8. Señalización de insulina.....	78
3.8.1. Expresión génica de IRS1 e IRS2.....	78
3.8.2. Expresión proteica de RI, IRS1 y su estado de fosforilación en tirosina.....	79
3.8.3. Expresión proteica de IRS2 y PI3K.....	80
4. DISCUSIÓN	
4.1. Consideraciones generales y parámetros séricos.....	83
4.2. Marcadores de EO y sistema de defensa antioxidante.....	84
4.3. UCP2 y su posible modulación vía PPARs.....	87
4.4. EO extramitocondrial: rol de la NAD(P)H oxidasa.....	89
4.5. Marcadores de inflamación.....	91

4.6. Metabolismo de carbohidratos.....	92
4.7. Metabolismo de lípidos.....	98
4.8. Vía de señalización de la insulina.....	100
4.9. Conclusiones.....	104
5. BIBLIOGRAFÍA	106
6. PUBLICACIÓN	146

## ***INTRODUCCIÓN***

---

## **1.1. Diabetes y pre-diabetes**

La prevalencia de diabetes se incrementa a nivel mundial en forma exponencial y se estima que en el año 2025 afectará a 300 millones de personas en el mundo (King y col., 1998). Según la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo realizada por el Ministerio de Salud Pública en el año 2009, en nuestro país el 9,6% de la población era diabética, valor que supera ampliamente el estimado para ese año por la Federación Internacional de Diabetes (Atlas IDF, 2009).

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es la forma más frecuente de la enfermedad y su incidencia aumenta a partir de la tercera década de vida (American Diabetes Association Clinical Practice Recommendations, 2007). Normalmente se asocia con otros factores de riesgo cardiovascular como hipertensión arterial, obesidad central, dislipemia y estilos de vida poco saludables (plan de alimentación inadecuado y sedentarismo) (Fall, 2001; Latin American Diabetes Association Clinical Practice Recommendations, 2006).

Por su parte la obesidad, especialmente la de tipo central, que aumenta el riesgo de desarrollar DMT2 y complicaciones cardiovasculares, también presenta carácter epidémico. En nuestro país, la tasa de sobrepeso/obesidad alcanzó el 53,4% según la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo (2009) del Ministerio de Salud Pública.

La aparición de la DMT2 está precedida por tolerancia a la glucosa alterada (TGA), en la cual ya están presentes, aunque con menor magnitud, los cambios descritos en la DMT2 (American Diabetes Association Clinical Practice Recommendations, 2005; Butler y col., 2003).

Estudios longitudinales sobre la base de un número importante de pacientes sugieren que la insulinoresistencia (IR) estaría presente muchos años antes del inicio clínico de DMT2 (Kahn, 1994). La IR puede definirse como una disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus efectos

biológicos sobre los tejidos blanco, tales como músculo esquelético, hígado y tejido adiposo. En estas condiciones, la respuesta de dichos tejidos a la acción de la hormona disminuye y, como consecuencia, el páncreas incrementa la producción y secreción de insulina para mantener la homeostasis metabólica dentro de los límites normales (Kahn, 1994). Esta sobrecarga funcional de la célula  $\beta$ , que inicialmente cubre la demanda, generalmente en los últimos años previos al inicio de la DMT2 agota a la célula, la secreción de insulina falla y esta falla es la primera manifestación clínica de la enfermedad.

De este modo, la DMT2 está precedida por un largo período de prediabetes y una patogénesis lenta y progresiva. Así, la historia natural de la diabetes se inicia con un período prediabético que comienza a los 30 años de edad o quizás antes, cuando el individuo en riesgo es normoglucémico pero presenta una sensibilidad a la insulina disminuida. Esto es seguido mucho tiempo después por una disminución en la secreción de insulina, y finalmente, unos pocos años más tarde, por la aparición clínica de la enfermedad (Kahn, 1994).

## **1.2. Condicionantes genéticos y ambientales**

La homeostasis de la glucosa depende del balance entre la producción de glucosa hepática y la utilización de la misma por tejidos insulino dependientes como el tejido adiposo y el músculo, e insulino independientes como el cerebro y el riñón (Bergman, 1989; Cahill, 1976). Si bien el ajuste fino del metabolismo de glucosa estaría influenciado por varias hormonas y metabolitos intermedios, el patrón de su utilización está básicamente regulado por hormonas secretadas por los islotes pancreáticos: insulina por las células  $\beta$  y glucagon por las células  $\alpha$ .

El depósito de glucosa depende primariamente de tres factores: la capacidad del cuerpo para secretar insulina de modo agudo o en respuesta sostenida, la habilidad de la insulina para inhibir la producción hepática de

glucosa y promover su absorción (insulino-sensibilidad) y la habilidad de la glucosa para entrar en la célula en ausencia de insulina (sensibilidad a la glucosa) (Bergman, 1989; Bergman y col., 1992). En pacientes con DMT2, existen al menos dos defectos patológicos: uno es la disminución de la sensibilidad a la insulina por parte de los tejidos periféricos o IR (De Fronzo y col., 1992; Himsworth y Kerr, 1942; Kahn, 1978; Kolterman y col., 1981; Olefsky, 1981; Reaven, 1988) y el otro, la incapacidad del páncreas endocrino para compensar dicha IR (Leahy y col., 1992; Orci y col., 1990; Porte, 1991; Turner y col., 1992). Esta última se manifiesta primero como un defecto en la secreción de insulina estimulada por glucosa y a su vez, por la incapacidad de la glucosa para promover la secreción de otros secretagogos de insulina, lo que conlleva a la pérdida de sensibilidad a la glucosa por parte de las células pancreáticas  $\beta$  (Kahn, 1994).

Estas dos fallas involucradas en la patogenia de la DMT2 son causadas por una combinación de defectos genéticos y ambientales que conducen a la progresión desde la tolerancia a la glucosa normal a la diabetes, pasando por un período de TGA como se dijo inicialmente. Entre los factores genéticos, hay genes que inician el proceso de la diabetes (De Meyts, 1993) y otros que determinan su desarrollo y progresión, pero que no son específicos de esta patología y juegan asimismo un rol importante en otras enfermedades (Kahn, 1994). Los factores ambientales tales como la dieta, la actividad física y la presencia de toxinas también pueden iniciar o favorecer el progreso de la enfermedad.

En este sentido, se ha demostrado que el desarrollo de DMT2 puede prevenirse, o al menos retrasarse, en personas con TGA mediante la implementación de cambios de estilo de vida (Diabetes Prevention Program Research Group, 2002; Tuomilehto y col., 2001) o mediante el empleo de diferentes drogas (Chiasson y col., 2002; Diabetes Prevention Program Research Group, 2002; Gerstein y col., 2006). Como resultado de ambas estrategias se demostró que los cambios de estilo de vida generaron la mejor relación costo-efectividad y una baja incidencia de aparición de efectos

secundarios adversos. Así se demuestra en el estudio “Diabetes Prevention Program”, en el cual se determinó que cambios en la dieta y la actividad física de los individuos reducen el desarrollo de esta patología en un 58% de los casos (Diabetes Prevention Program Research Group, 2002).

### **1.3. Alimentación no saludable: dietas ricas en fructosa**

Entre los factores ambientales mencionados, la composición de la dieta juega un rol fundamental en el desarrollo de la obesidad y la DMT2. Si bien el efecto adverso más destacado de la composición de las dietas se relaciona con su acción sobre la acumulación de grasa corporal (Bray y col., 2004; Bray y Popkin, 1998; Elliot y col., 2002), la sobrecarga de algunos azúcares – sacarosa o fructosa – puede conducir a la IR independientemente del incremento del aporte calórico y la acumulación de grasa visceral o corporal (Faeh y col., 2005; Kraegen y col., 1991; Pagliassotti y col., 1996; Thresher y col., 2000).

Es interesante destacar que en forma paralela al incremento de la prevalencia de diabetes y obesidad, se detecta a nivel mundial no sólo un aumento en el consumo total de calorías, sino también un cambio significativo en el tipo de nutrientes consumidos. Los jarabes de maíz ricos en fructosa se convirtieron en los edulcorantes utilizados en las bebidas carbonatadas, mermeladas y otros productos de consumo diario. En Estados Unidos, por ejemplo, el consumo anual de fructosa *per capita* aumentó en el período 1970-1997 de 0,2 a 28 kg (Wei y col., 2007). En consecuencia, algunos autores sugieren que este incremento en el consumo de fructosa contribuiría a la actual epidemia de obesidad y DMT2 (Bray y col., 2004; Elliott y col., 2002; Gross y col., 2004).

Esta hipótesis se sustenta en abundante evidencia experimental. En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la administración en forma crónica de fructosa o sacarosa a ratas normales induce en estos animales



tanto alteraciones metabólicas (hipertrigliceridemia y TGA) como endocrinas (hiperinsulinemia, hiperleptinemia e IR – con un elevado índice HOMA-IR), cambios en el metabolismo hepático de glúcidos y lípidos e incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), paralelamente con una disminución en la expresión y actividad de enzimas del sistema antioxidante (Alzamendi y col., 2009; Castro y col., 2011; Francini y col., 2009; 2010; Rebolledo y col., 2008).

Por otro lado, el incremento plasmático de triglicéridos (TG), colesterol y ácidos grasos libres (ACGL) demuestra que también hay una respuesta a la insulina alterada en los tejidos periféricos (Anuradha y Balakrishnan, 1999; Girard y col., 2005; Kelley y col., 2004; Nandhini y col., 2002; Pagliassotti y Prach, 1995; Thirunavukkarasu y col., 2004).

Otros autores demostraron en ratas alimentadas con sacarosa, un incremento en la gluconeogénesis hepática, con reducción de la habilidad de la insulina para inhibir la producción hepática de glucosa y el consecuente desarrollo de hiperglucemia (Bizeau y col., 2001; Commerford y col., 2002; Pagliassotti y col., 1994). Por otra parte, en ratas UCD-T2DM (diabéticas genéticamente), el consumo crónico de fructosa acelera el inicio de la diabetes al reducir la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa y promover dislipemia, estrés oxidativo (EO) e inflamación (Cummings y col., 2010).

A nivel hepático, el consumo de dietas ricas en sacarosa o fructosa produce IR en forma independiente de la obesidad (Ishimoto y col., 2011; Stanhope y col., 2009) y aún en condiciones de restricción calórica (Nakagawa y col., 2006; Roncal-Jimenez y col., 2011), así como también provoca incremento en el depósito de lípidos y gluconeogénesis (Pagliassotti y col., 1996; Thresher y col., 2000; Wei y Pagliassotti, 2004). Por todo ello, a estas dietas se les atribuye un rol patogénico central en la esteatosis hepática y en el síndrome metabólico.

Así como se demostró en pacientes (Diabetes Prevention Program Research Group, 2002; Tuomilehto y col., 2001), es posible revertir los

cambios inducidos por la dieta también en animales sometidos a ejercicio físico, al menos de forma parcial (Zavaroni y col., 1982). Esto último podría deberse a que los intermediarios metabólicos generados por la sobrecarga de nutrientes no se acumulan, o bien se emplean en rutas metabólicas alternativas (Kelley y col., 2004).

Estos resultados demuestran que el aumento en el suministro de fructosa al hígado altera el medioambiente normal postprandial hepático (Brosnan y col., 1991; Busserolles y col., 2002; Kelley y col., 2004; Pagliassotti y Prach, 1995; 2003; Sestoft, 1974; Wei y Pagliassotti, 2004). Wei y col. (2007) proponen que estos cambios inducen una acumulación de metabolitos intermediarios que actúan como señales de tal exceso de nutrientes en la dieta. Adicionalmente, la absorción de azúcares en exceso a largo plazo conduciría a la desregulación del metabolismo lipídico (Kelley y col., 2004) y a la aparición de un estado de IR, debido en parte a la desregulación de las vías de estrés e inflamación en el hígado. Sin embargo, la magnitud del estrés hepático inducido por fructosa depende de la concentración de la misma y de la duración de la exposición a dicha sobrecarga, como así también de factores genéticos y biológicos (Bizeau y col., 2001; Fried y Rao, 2003; Horton y col., 1997; Pagliassotti y Prach, 1995).

#### **1.4. Metabolismo de la fructosa en el hígado**

La respuesta hepática a los cambios en la composición y en la velocidad de provisión de nutrientes se relaciona con su ubicación anatómica y las características funcionales específicas de este órgano. El hígado, a través de la vena porta, recibe el flujo de aminoácidos y azúcares simples absorbidos así como las hormonas pancreáticas y péptidos intestinales o incretinas, con lo cual su ubicación anatómica le confiere un rol amortiguador clave (Bergman, 2000; Cherrington, 1999).

Pero a diferencia de la glucosa, que es empleada por todos los tejidos del cuerpo, la fructosa se metaboliza fundamentalmente en el hígado (Bantle y col., 2000; Hallfrisch, 1990), lo cual convierte a este órgano en el sitio primario para su extracción y metabolismo. En consecuencia, diferentes autores proponen que la alteración en la regulación del metabolismo hepático de carbohidratos y lípidos es el cambio más temprano y con consecuencias más significativas sobre la salud generado por el consumo de fructosa (Bizeau y Pagliassotti, 2005; 2004; Pagliassotti y Horton, 2004). Dicha alteración metabólica sería una de las causas de la IR hepática (Bezerra y col., 2000; Blakely y col., 1981), acompañada de disfunción inmunometabólica, con reacción inflamatoria e infiltración grasa (esteatosis) hepática (Hotamisligil, 2004).

Aunque la glucosa y la fructosa comparten algunas propiedades, son químicamente diferentes. Esta variación a nivel químico provoca una absorción intestinal diferencial hacia la vena porta y una mayor velocidad de extracción esplácnica de la fructosa respecto a la glucosa (Samuel, 2011). En consecuencia, toda la fructosa absorbida se dirige rápidamente hacia el hígado, el cual además posee un sistema activo enzimático o “vía de la fructosa” para su metabolismo, constituido por las enzimas fructoquinasa (FQ), aldolasa B y trioquinasa (Heinz y col., 1968; Mayes, 1993). Debido a la acción de este sistema enzimático, el 55 (postprandio) al 71% (etapa postabsortiva o ayuno) de la fructosa absorbida permanece en el hígado. El remanente circula hacia el resto de los tejidos en una concentración plasmática muy baja (1,1-2,2 mM) (Topping y Mayes, 1971).

En los hepatocitos, la fructosa se transporta al citoplasma a través del transportador de glucosa (GLUT) 2, donde rápidamente se fosforila a fructosa-1-fosfato (F-1-P) mediante la acción de la enzima FQ, tras lo cual se convierte en gliceraldehído y dihidroxiacetona-fosfato (DHA-P) por acción de la aldolasa B. A través de esta vía enzimática, la fructosa evita el mayor punto de control de la glucólisis: la fosforilación mediante la enzima

fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) (Mayes, 1993; Kelley y col., 2004), tal como se observa en la Figura 1.

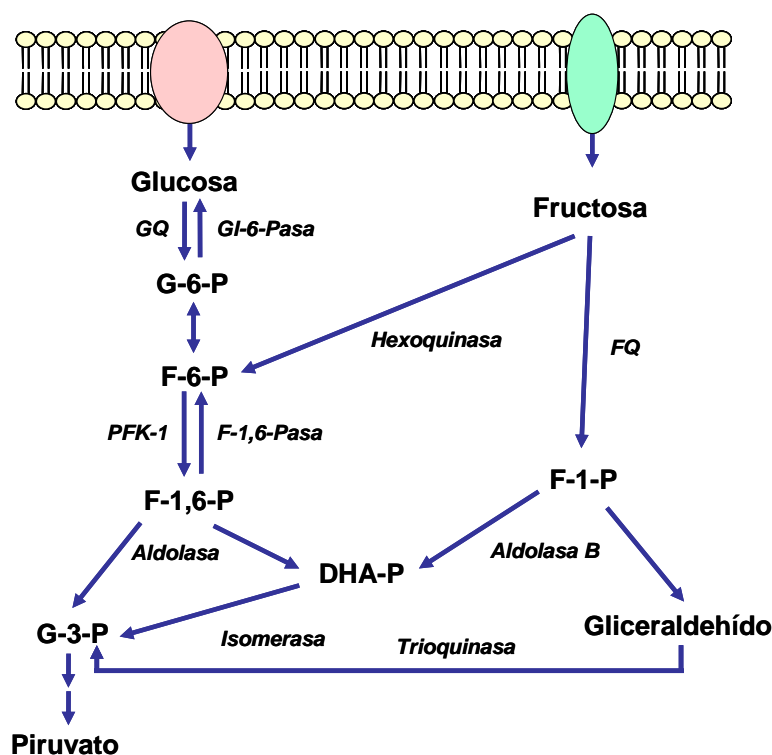


Figura 1: metabolismo hepático de glucosa y fructosa

Por otro lado, la F-1-P estimula la absorción de glucosa en el hígado (Davies y col., 1990; Shiota y col., 1998), por lo que la misma se incrementa considerablemente en presencia de fructosa. A diferencia de la PFK-1, la FQ no es inhibida por ATP, y por ende, no está bajo el severo control energético propio de la glucólisis. En este punto debemos enfatizar que las propiedades y efectos metabólicos únicos de la fructosa en el hígado dependen de estas dos propiedades: su rápida captación por el órgano y su canalización en las vías glucolítica y gluconeogénica a nivel de las triosas fosfato y, en consecuencia, sin enfrentar el paso regulador de la PFK-1 (Mayes, 1993). Adicionalmente, a diferencia de la glucoquinasa (GQ), la actividad de la FQ no se ve afectada por acción de la insulina.

Tal como se mencionó, la F-1-P se escinde en gliceraldehído y DHA-P por acción de la aldolasa B. Mientras que la enzima triosa isomerasa convierte

DHA-P en gliceraldehído-3-fosfato (G-3-P), la trioquinasa fosforila el gliceraldehído y también genera G-3-P. En este paso, el G-3-P entra en la vía glucolítica y genera acetil coenzima A (acetil-CoA), que puede oxidarse en la mitocondria a través del ciclo de Krebs o bien canalizarse hacia la síntesis de ácidos grasos. Las triosas también contribuyen a la síntesis de lípidos a través de la provisión de glicerol-3-fosfato, el cual sirve como esqueleto para la síntesis de TG (Fried y Rao, 2003) (Figura 2).

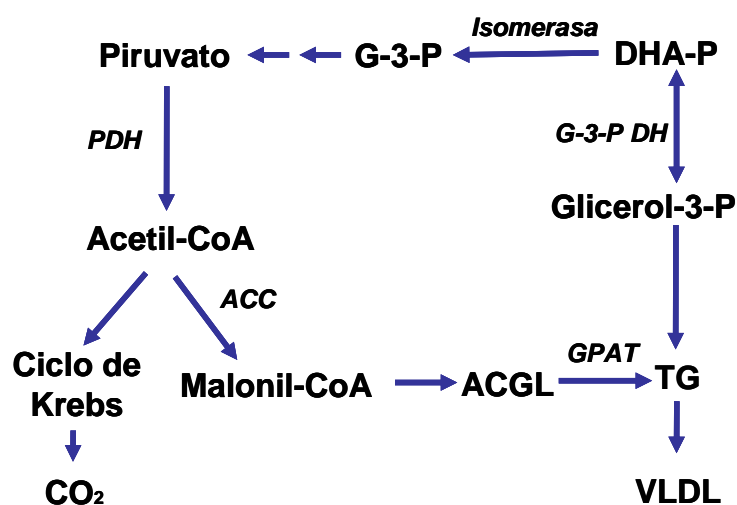
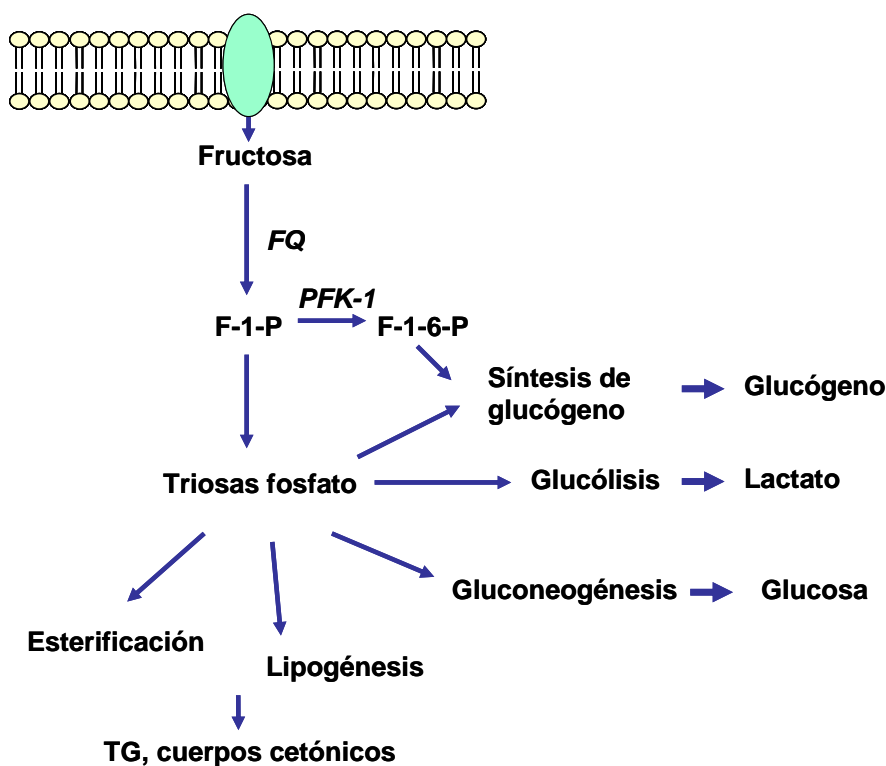


Figura 2: metabolismo hepático de las triosas

Es importante tener en cuenta en este punto que la conversión de fructosa en triosas fosfato es una vía rápida insulinoindependiente debido al bajo  $K_m$  de la FQ por su sustrato y por la ausencia de una retroalimentación negativa mediante ATP o citrato. Debido a ello, la fructosa incrementa la provisión de sustratos a nivel de triosas fosfato en forma descontrolada a todas las vías metabólicas que comienzan en este punto.

La mayor cantidad de triosas fosfato generadas por el metabolismo de la fructosa se destinan a la síntesis de glucosa y glucógeno a través de la vía gluconeogénica (Koo y col., 2008); sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, los carbonos derivados de la fructosa pueden convertirse en

precursores de ácidos grasos – acetil-CoA – o suministrar glicerol para la síntesis de TG (Figura 3).



**Figura 3:** metabolismo hepático de la fructosa y su contribución a través de las triosas fosfato a diferentes vías metabólicas

Esta capacidad lipogénica de la fructosa lleva al depósito de TG no solamente en el tejido adiposo, sino también en el hígado, lo cual conduce a la esteatosis hepática y eventualmente a la IR y dislipemia. Debido a que el aumento del metabolismo lipídico está estrechamente relacionado con la aparición de obesidad e IR, se sugirió que el mecanismo por el cual la fructosa promueve el desarrollo del síndrome metabólico está relacionado a su capacidad lipogénica (Dekker y col., 2010). Esta hipótesis se apoya en un estudio hecho en humanos a los que se suministró durante 10 semanas una dieta donde el 25% de las calorías aportadas por carbohidratos se reemplazó por bebidas ricas en fructosa. En el mismo trabajo se detectó un incremento en

la lipogénesis hepática *de novo*, alteraciones del metabolismo lipídico y remodelación de lipoproteínas (Stanhope y col., 2009).

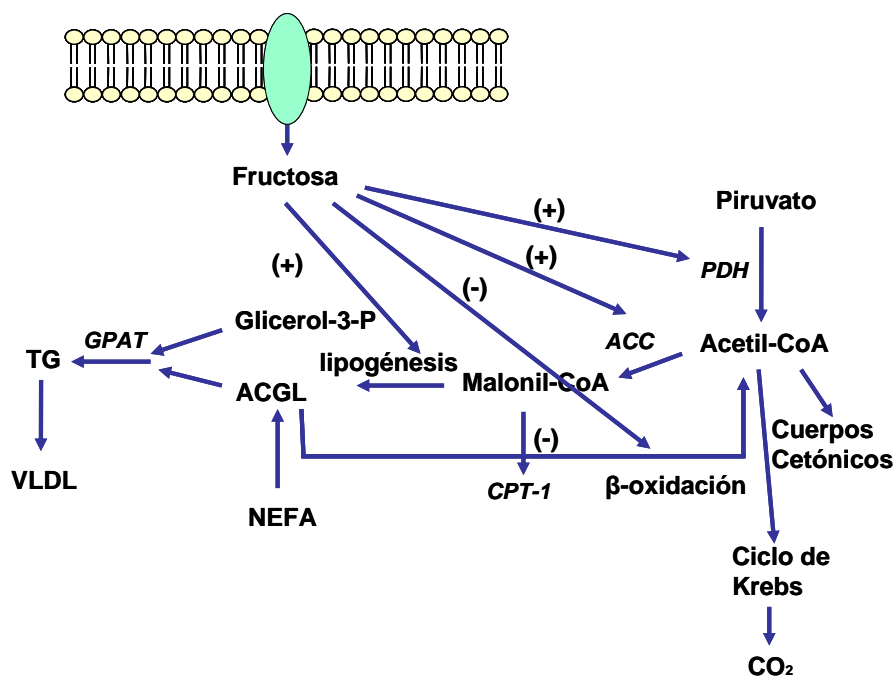
Asimismo, el aumento en el consumo de bebidas ricas en fructosa durante 8 semanas aumentó los niveles de TG plasmáticos en el postprandio y promovió la acumulación de grasa abdominal. Este efecto lipogénico *de novo* atribuido al incremento de la ingesta de fructosa se registró también en estudios de una semana de tratamiento, lo cual sugiere que el proceso ocurre de modo rápido y precoz (Le Ka y col., 2009).

La “vía de la fructosa” en el hígado promueve el aumento de la DHA-P y en consecuencia el aumento de las concentraciones de piruvato y glicerol-3-fosfato. En pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (NAFLD), la expresión génica y proteica, así como la actividad de la enzima FQ – primera enzima de la vía – se encuentran aumentadas respecto a los individuos normales, lo cual es consistente con el conocido efecto regulador positivo de la fructosa sobre esta enzima en hígado de ratas (Ouyang y col., 2008).

Mientras que el glicerol-3-fosfato actúa como esqueleto para la síntesis de TG, el piruvato podría tener dos destinos metabólicos: convertirse en lactato o ingresar a la mitocondria para generar acetil-CoA mediante la acción del complejo piruvato deshidrogenada (PDH). Carmona y Freedland (1989) demostraron que una dieta rica en fructosa (DRF) incrementa la incorporación de  $^3\text{H}_2\text{O}$  a las grasas y, por lo tanto, sugiere la activación de la PDH. Años más tarde, Park y col. (1992) demostraron que la ingesta crónica de fructosa incrementa la forma activa (desfosforilada) de la mencionada enzima. Este cambio se explica por una disminución paralela de la actividad de la enzima PDH quinasa mitocondrial, uno de los reguladores de la actividad de PDH. Sin embargo, si bien estos cambios podrían explicar el mecanismo por el cual la fructosa induce hipertrigliceridemia en ratas (Park y col., 1992), no existe a la fecha evidencia de que esto ocurra también en humanos.

Es interesante destacar que mientras una infusión de fructosa en forma conjunta con ácidos grasos no esterificados (NEFA) aumenta la esterificación

de ácidos grasos y secreción de VLDL, también disminuye la oxidación de ácidos grasos. La enzima carnitina-palmitoiltransferasa-1 (CPT-1) es la responsable de la co-regulación de ambos procesos: síntesis y oxidación de ácidos grasos, ya que cataliza el transporte de los mismos desde el citosol hacia la matriz mitocondrial para su subsiguiente oxidación, mientras que los ácidos grasos que no pueden incorporarse a esta vía se esterifican, convirtiéndose en TG. La CPT-1 es inhibida por el malonil-CoA, producto de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC). El metabolismo de fructosa aumenta la formación de malonil-CoA y en consecuencia este efecto podría explicar el “cambio de vías” desde oxidación a síntesis de lípidos que induce la ingesta de fructosa (Figura 4).



**Figura 4:** metabolismo hepático de fructosa y contribución al metabolismo de lípidos

El incremento en TG es generalmente más pronunciado en pacientes obesos con IR, mientras que los efectos de la fructosa sobre el metabolismo lipídico hepático son más marcados en condiciones de hiperglucemia. Esto sugiere que el consumo de fructosa exacerba un estado metabólico



desfavorable, especialmente en pacientes con diabetes y con un control glucémico pobre (Huang y col., 2011).

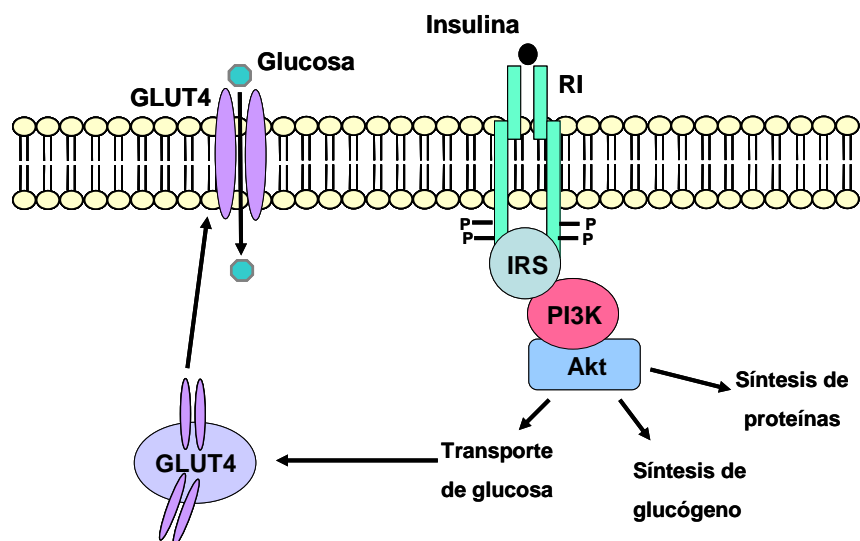
### **1.5. Mecanismos moleculares de la IR y su relación con el consumo de fructosa**

La insulina es una hormona clave en la homeostasis de la glucosa. Su mecanismo de acción en los tejidos sensibles a la misma es a través de la activación de una cascada de señales intracelulares que se desencadena al unirse la hormona a su receptor. El receptor de insulina (RI) es una proteína transmembrana con actividad tirosina-quinasa (Czech y col., 1985; Rosen, 1987; White y Kahn, 1986) que posee sitios de fosforilación en tirosinas, serinas y treoninas. La fosforilación de los residuos de tirosina incrementa la actividad quinasa del receptor, mientras que la fosforilación en serina o treonina disminuye dicha actividad (Blake y Strader, 1986; Bollag y col., 1986; Dickens y col., 1992; Lewis y col., 1990; Takayama y col., 1988). De este modo, la actividad quinasa del receptor activado por insulina y por lo tanto su capacidad de transducción de señal, están reguladas positiva y negativamente por la fosforilación en tirosina y serina/treonina, respectivamente.

A nivel estructural, el RI consta de dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  suprime la actividad tirosina quinasa presente en la subunidad  $\beta$ . Cuando la subunidad  $\alpha$  se elimina o modifica por proteólisis (Shoelson y col., 1988; Tamura y col., 1983) o por mutagénesis *in vitro* (Ellis y col., 1987; Gronskov y col., 1993), la actividad tirosina quinasa de la subunidad  $\beta$  se activa constitutivamente.

La unión de dos moléculas de insulina a la subunidad  $\alpha$  de su receptor induce autofosforilación en residuos de tirosina de las subunidades  $\beta$  del mismo. Estos dominios fosforilados son capaces entonces de interactuar con los sustratos del receptor de insulina (IRS) 1 y 2. Ambos sustratos poseen

sitios de fosforilación en serina y tirosina y estos últimos se activan en respuesta al estímulo con insulina (Sun y col., 1993). Dichas fosforilaciones hacen que los IRS interaccionen no covalentemente con otras proteínas intracelulares (Backer y col., 1992; Lavan y col., 1992; Myers y White, 1993), lo que les permite amplificar la señal. La interacción ocurre a través de dominios específicos de las proteínas blanco llamados dominios SH2 (por la homología al producto del oncogen viral src) (Koch y col., 1991; Schlessinger, 1993). Estos dominios se encontraron en más de 20 tipos diferentes de proteínas, entre ellas fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) y fosfolipasa C $\gamma$ . En la Figura 5 puede visualizarse la cascada de señalización de insulina y algunas de las acciones que media dicha cascada.



**Figura 5:** cascada de señalización de insulina

Experimentalmente, se observó que segundos después de inyectar insulina en ratas y ratones, el IRS1 se fosforilaba en residuos de tirosina y se unía a PI3K (Folli y col., 1992). La activación de PI3K estimula la absorción de glucosa vía la translocación del transportador de glucosa insulino-sensible GLUT4 desde el pool intracelular a la membrana plasmática (Fingar y col., 1993; Kanai y col., 1993; Okada y col., 1994; Simpson y Cushman, 1986).

Ratones *knock-out* para el RI hepático desarrollan IR, intolerancia a la glucosa severa y una falla en la supresión de la producción de glucosa (Michael y col., 2000). En estos ratones, la infusión de altas dosis de insulina falla en la supresión de producción de glucosa, lo cual demuestra que los efectos directos e indirectos de la hormona requieren que su vía de señalización se encuentre intacta (Fisher y Kahn, 2003). Otro estudio demuestra que IRS2 es necesario para la acción eficiente de la insulina en el hígado (Dong y col., 2006).

En modelos animales de DMT2 como los ratones *ob/ob*, hay evidencia sobre alteraciones tempranas en la cascada de señalización de la insulina (Exton, 1990; LeMarchand-Brustel y col., 1985; Lord y Atkins, 1985; Saad y col., 1992; Soll y col., 1975; Taberner y Connelly, 1991). Por ejemplo, hay una disminución del 50% en la fosforilación del RI y un 80% en el IRS1 en ratones obesos diabéticos. Este hecho se asocia a una disminución del 90% en la actividad de PI3K estimulada por insulina (Folli y col., 1992). Asimismo, en ratas tratadas durante una, dos o cinco semanas con dieta rica en sacarosa, se observa un incremento en la fosforilación en serina de IRS1, disminución en la fosforilación en tirosina de IRS1 e IRS2, en la asociación de ambos con la subunidad p85 de PI3K, la actividad de PI3K y la fosforilación de Akt (Wei y col., 2007). Resultados similares se observaron en animales tratados con fructosa (Bezerra y col., 2000).

Por otra parte, en hepatocitos aislados de ratas tratadas con sacarosa durante una semana, la fosforilación en tirosina de IRS1 y la supresión de liberación de glucosa inducidas por insulina están disminuidas (Wei y col., 2004). Del mismo modo, en estudios *in vitro* de hepatocitos primarios cultivados en presencia de glucosa y fructosa, se detecta un aumento en la fosforilación del residuo Serina 307 (Ser<sup>307</sup>) del IRS1 en presencia o ausencia de insulina y una reducción en la fosforilación en tirosina de IRS1 e IRS2 en presencia de insulina (Wei y col., 2005).

Entre las proteínas fosfatasa que pueden atenuar la señalización de la insulina se encuentran la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), JNK. La PTP1B regula negativamente la fosforilación en tirosina del RI y de las proteínas IRS (Gum y col., 2003; Zinker y col., 2002). La JNK también interfiere en pasos tempranos de la cascada de señalización de la insulina, en parte, al fosforilar Ser<sup>307</sup> en IRS1 (Aguirre y col., 2002; Hirosumi y col., 2002). La actividad de JNK se encuentra incrementada en hígados de ratones alimentados con una dieta rica en grasas (Hirosumi y col., 2002), mientras que en hamsters alimentados con una DRF se detecta un aumento en la expresión proteica de PTP1B a nivel hepático (Taghibiglou y col., 2002).

Debido a que alteraciones similares se manifiestan en diversos modelos animales de DMT2, se sugiere que dichas alteraciones son adquiridas más que genéticas. En estudios en humanos, se observaron defectos en la actividad quinasa del RI en pacientes con DMT2 (Arner y col., 1987; Maegawa y col., 1991; Mosthaf y col., 1991). Sin embargo, estos defectos parecerían ser adquiridos, ya que la mayoría de los pacientes no presentaron mutaciones en el RI (Kim y col., 1992; O'Rahilly y col., 1991). En apoyo a esta hipótesis, la pérdida de peso mejora la alteración en la función y la actividad quinasa del receptor (Freidenberg y col., 1988).

## **1.6. Diabetes e inflamación**

La inflamación de bajo grado que caracteriza a la DMT2 contribuye en gran medida al desarrollo de esta patología (Hotamisligil, 2006; Wellen y Hotamisligil, 2005). Se observó que la expresión de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) se incrementa en modelos de obesidad murinos (ratas *fa/fa* y ratones *ob/ob*) y que la remoción de mediadores de inflamación o de componentes de la cascada, como el TNF $\alpha$ , su receptor, JNK e IKK, protegen contra la IR en modelos de ratones genéticamente obesos o inducidos por la dieta (Hirosumi y col., 2002;

Uysal y col., 1997). En ratones *knock-out* para interleuquina (IL) 1 $\alpha$ , los niveles séricos de glucosa en ayuno e insulina son menores que en los animales control, con una mejora de la sensibilidad a la insulina (Matsuki y col., 2003). En humanos, el tratamiento con drogas que alteran dichas vías, como los salicilatos, mejora la sensibilidad a la insulina (Hirosumi y col., 2002; Hotamisligil y col., 1993; Hundal y col., 2002; Uysal y col., 1997; Yuan y col., 2001).

Del mismo modo se demostró en diversos modelos animales que el TNF $\alpha$  está involucrado en la patogénesis de NAFLD (Bergheim y col., 2008; Ma y col., 2008; Tomita y col., 2006). Es de particular interés el trabajo de Kanuri y col. (2011a), quienes demuestran que dicha patología puede ser iniciada por la administración de fructosa. En dicho estudio, se observó que en ratones alimentados con fructosa, se halla incrementada la translocación intestinal de las endotoxinas bacterianas y de TNF $\alpha$ , lo cual induce esteatosis hepática. Dichas alteraciones son atenuadas por la administración de antibióticos o por la pérdida del receptor de endotoxinas tipo Toll (TLR) -4 (Bergheim y col., 2008; Spruss y Bergheim, 2009). En ratones *knock-out* para el receptor de TNF $\alpha$ , se registró una disminución en los marcadores de inflamación y en la acumulación de grasa hepática luego de la administración crónica de fructosa. Estos resultados confirman el rol fundamental de TNF $\alpha$  en el inicio de NAFLD.

Asimismo, se sugirió que la delección del receptor de TNF $\alpha$  activaría la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en el hígado, provocando la supresión de la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP)1c y en consecuencia de la sintasa de ácidos grasos (FAS), protegiendo así contra el desarrollo del hígado graso (Kanuri y col., 2011a). De todos modos, los mecanismos subyacentes y las vías de señalización involucradas no están dilucidadas completamente y deben ser estudiadas con mayor profundidad.

Por otra parte, el TNF $\alpha$  puede inducir la expresión proteica del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) -1 (Kanuri y col., 2011b) y el *knock-out* de PAI-1 previene el inicio de esteatosis inducida por fructosa. Estos resultados refuerzan el concepto de que TNF $\alpha$  media una fase temprana del daño hepático (Kanuri y col., 2011b). En un estudio piloto, se observó que pacientes con NAFLD consumen significativamente más fructosa que los pacientes controles y presentan un incremento en los niveles plasmáticos de endotoxinas y PAI-1, así como también en los niveles de ARNm hepático de PAI-1 y TLR-4. Esto sugiere que dichos cambios contribuyen al desarrollo de NAFLD también en humanos (Thuy y col., 2008).

A nivel de la cascada de señalización de insulina *in vitro*, al exponer células mieloides 32D a TNF $\alpha$  o a elevados niveles de ACGL se estimula la fosforilación en serina de IRS1 (Aguirre y col., 2000; Hotamisligil y col., 1996; Yin y col., 1998). Esta alteración inhibe así la cascada de señalización y en consecuencia la acción de la insulina (Aguirre y col., 2002; Hotamisligil y col., 1996; Paz y col., 1997). La fosforilación en serina de IRS1 por diversos factores inflamatorios parecería ser el evento clave que afecta la señalización del RI (Wellen y Hotamisligil, 2005).

JNK pertenece a una familia de serina-treonina quinasas activadas en respuesta a estrés del retículo endoplásmico, citoquinas y ácidos grasos. En su forma activa, JNK se asocia a IRS1 y lo fosforila en Ser<sup>307</sup>, alterando la acción de la insulina (Gao y col., 2004; Ozcan y col., 2004). En obesidad, la actividad de JNK está incrementada en músculo, hígado y tejido adiposo. Como se citó anteriormente, la pérdida de JNK1 previene el desarrollo de IR y diabetes en modelos murinos genéticos y dietarios de obesidad (Hirosumi y col., 2002). En animales adultos, la modulación hepática de JNK1 produce efectos sistémicos en el metabolismo de glucosa, lo que resalta la importancia de esta vía en el hígado (Nakatani y col., 2004).

Por su parte, IKK $\beta$  (constituyente del complejo inhibidor de I $\kappa$  $\beta$ ) puede fosforilar residuos de serina en IRS1 (Gao y col., 2002; Yin y col., 1998) o

bien fosforilar al inhibidor del factor nuclear kappa-B (NF $\kappa$ B), permitiendo la activación de NF $\kappa$ B, factor de transcripción que estimula la expresión de varios mediadores inflamatorios como TNF $\alpha$  e IL6 (Shoelson y col., 2003). La activación de IKK $\beta$  en el hígado y en células mieloides parece contribuir a la IR inducida por obesidad (Wellen y Hotamisligil, 2005).

Asimismo, al tratar ratones alimentados con una dieta rica en sacarosa con un inhibidor farmacológico de IKK $\beta$  se redujeron la ganancia de peso, la acumulación de grasa visceral, la infiltración de macrófagos y la producción de citoquinas proinflamatorias. A nivel hepático, se observó una inhibición en la activación de NF $\kappa$ B, con una disminución de la respuesta inflamatoria e incremento en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, previniendo así la esteatosis hepática, con mejora de la respuesta antioxidante de este órgano (Beraza y col., 2008).

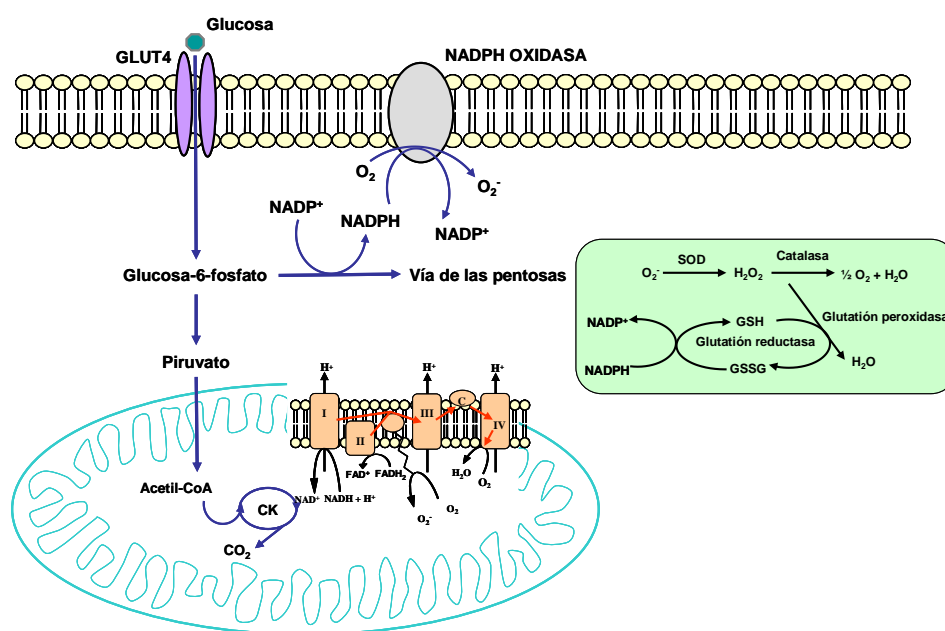
### **1.7. Estrés oxidativo y dieta rica en fructosa**

Se define al EO como un desbalance en el estado de óxido/reducción (redox) que se produce por una deficiencia en el sistema de defensa antioxidante endógeno y/o por el aumento en la producción de ROS (Padmalayan y col., 2009). En el caso de la DMT2, el EO es un factor patogénico clave que acelera el inicio y progresión de esta enfermedad (Baynes, 1991; Cakatay y col., 2000; Luz y col., 2009; Padmalayan y col., 2009). El mismo, en estado crónico, provoca inflamación y disfunción mitocondrial conduciendo a IR y, finalmente, a un estado de diabetes.

Los ROS se generan por una sobrecarga de electrones producto de un aumento en el suministro de sustratos a oxidar, provenientes de las distintas vías generadoras de los mismos:  $\beta$ -oxidación mitocondrial de ácidos grasos (St-Pierre y col., 2002),  $\beta$ -oxidación peroxisomal de ácidos grasos por la acil-coenzima A oxidasa (Osmundsen y col., 1991),  $\omega$ -oxidación microsomal de ácidos grasos por el citocromo P450 2E1 (Chitturi y Farrell, 2001), glucólisis,

ciclo de Krebs y la reducción del oxígeno por el complejo NAD(P)H-oxidasa (Krieger-Brauer y Kather, 1992) (Figura 6).

Los sistemas antioxidantes presentes en una célula pueden ser enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa [SOD], glutatión peroxidasa [GPx]) (Nordberg y Arner, 2001) y no enzimáticos (niveles plasmáticos de tocoferoles, vitamina E, contenido celular de glutatión reducido [GSH]). Estos sistemas se activan en respuesta a una producción elevada de ROS con el fin de neutralizarlos y, por lo tanto, evitan que los ROS dañen otras moléculas. Pero por otro lado, la acumulación de ROS podría ser interpretada por la célula como un desbalance entre la disponibilidad de sustratos y su capacidad oxidativa. En este contexto, y como reacción adaptativa, la célula podría responder con una disminución en la señal de insulina y como consecuencia, disminución en la absorción de glucosa, estableciendo así una posible relación entre EO e IR (Evans y col., 2002).



**Figura 6:** Sitios de producción de ROS y sistema de defensa antioxidante

Además del daño directo ocasionado por los ROS en las células por oxidación de ADN, proteínas y lípidos, existe un daño indirecto debido a la



activación de una variedad de cascadas de señales intracelulares sensibles al estrés:  $\text{NF}\kappa\beta$ , p38 MAPK y JNK/SAPK. Esta activación resulta en un incremento en la expresión de genes que juegan un rol importante en la etiología de las complicaciones tardías de la diabetes. Observaciones *in vivo* e *in vitro* sugieren que la activación de diferentes cascadas de señales de estrés resultan en IR y secreción de insulina alterada. Un mecanismo para explicar este comportamiento implicaría la fosforilación de múltiples blancos incluyendo el RI y las proteínas IRS. Como se mencionó anteriormente, la fosforilación en serina del IRS reduce su habilidad de sufrir fosforilación en tirosina y aceleraría su degradación, lo que aportaría las bases moleculares de la IR inducida por EO (Newsholme y col., 2007).

Existe fuerte evidencia de que los cambios en las señales intracelulares inducidos por EO resultan en inflamación crónica e IR *in vivo* (Brownlee, 2005; Fridlyand y Philipson, 2005). Los resultados obtenidos por Matsuzawa-Nagata y col. (2008) también apoyan la posibilidad de que los ROS induzcan un estado de IR, resultando en un aumento de la obesidad abdominal y altos niveles circulantes de  $\text{TNF}\alpha$  y ACGL. La dieta rica en grasas promueve el EO potencialmente mediante el incremento de la expresión de genes implicados en la producción de ROS en el hígado y tejido adiposo (Matsuzawa-Nagata y col., 2008). Bloch-Damti y col. (2006), observaron que el EO aumenta la fosforilación en serina de IRS1 e IRS2, disminuye el contenido proteico de IRS1 y causa IR en adipocitos 3T3-L1.

Numerosos autores (Assy y col., 2008; Ouyang y col., 2008) sugirieron que la DRF induciría un estado de hígado graso que podría conllevar al desarrollo de NAFLD. Según Assy y col. (2008), el consumo de bebidas ricas en fructosa es el factor de riesgo más frecuente para la infiltración grasa del hígado en pacientes sin otros factores de riesgo cardiovascular clásicos (diabetes, obesidad, hiperlipidemia o hipertensión). Sin embargo, aún en condiciones de lipogénesis *de novo* aumentada, la esteatosis hepática ocurriría sólo si el almacenamiento de lípidos aumenta debido a una exportación anormal de los mismos fuera del hepatocito o si existe una utilización menor

vía disminución de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. Esto sugiere la participación de otros mecanismos en el efecto deletéreo de la fructosa sobre el hígado (Spruss y Bergheim, 2009).

Abundante evidencia experimental demuestra que dietas con fructosa provocan EO en diversos órganos (Armutcu y col., 2005; Berheim y col., 2008; Busserolles y col., 2002; 2003; McDonald, 1995; Suganthi y col., 2007). En nuestro caso, en trabajos previos demostramos que la administración de una DRF durante tres semanas induce en ratas normales un aumento de marcadores de EO y una disminución de la expresión y actividad de enzimas antioxidantes en el hígado (Castro y col., 2011; Francini y col., 2009; 2010).

Este incremento en la formación de ROS podría ser un contribuyente importante a la génesis del daño metabólico hepático, la IR del hepatocito, la respuesta inflamatoria local, la disfunción del islote pancreático y el desarrollo de DMT2 tanto en roedores (Evans y col., 2003; 2005) como en humanos (Farrell y col., 2008). En apoyo a esta hipótesis, recientemente se demostró que la vía de señalización inflamatoria se puede activar por estresores metabólicos tanto intracelulares como extracelulares (Wellen y Hotamisligil, 2005). Adicionalmente se demostró en modelos de obesidad que la producción aumentada de ROS activa la vía inflamatoria (Furukawa y col., 2004; Lin y col., 2005). Finalmente se determinó que varias citoquinas proinflamatorias están críticamente involucradas tanto en la IR (Tilg y Moschen, 2008) como en el desarrollo del hígado graso (Sanyal y col., 2001).

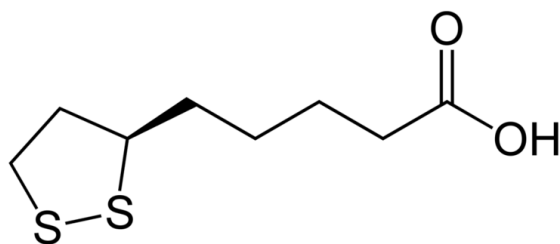
Sin embargo, es aún una incógnita cómo la producción elevada de ROS conduce a un estado de IR *in vivo*. Se sugirió que el incremento en la expresión de genes involucrados en la producción de ROS ocurre antes del inicio de la IR y la obesidad en tejido adiposo e hígado (Matsuzawa-Nagata y col., 2008).

## **1.8. Ácido lipoico y dieta rica en fructosa**

Si la hipótesis del efecto nocivo del EO sobre la célula y su posible posición troncal en el desarrollo de las alteraciones asociadas (cambios metabólicos, IR e inflamación) fuese correcta, es posible que la administración de una sustancia capaz de reducir el EO *in vivo* pueda disminuir la progresión del daño celular en el tratamiento clínico de la diabetes.

Numerosos trabajos demostraron que diferentes compuestos (probióticos, timosina alfa-1, antibióticos, captopril, bezafibratos, oligofructosa, fenofibratos) administrados conjuntamente con la DRF ejercen simultáneamente un efecto protector sobre el daño oxidativo y el desarrollo de NAFLD (Armutcu y col., 2005; Assy y col., 2008; Berheim y col., 2008; Busserolles y col., 2003; Nagai y col., 2002; Suganthi y col., 2007). Sin embargo, en la mayoría de ellos la intervención no estuvo dirigida ni a modificar el metabolismo de la fructosa ni el sistema oxidante/antioxidante hepáticos. En consecuencia, la evidencia experimental disponible tan sólo sugiere que la fructosa participaría en la patogénesis de NAFLD, pero no hay estudios específicos que hayan demostrado esta relación.

En este sentido, se demostró que la administración de ácido  $\alpha$ -lipoico (AL) -ácido 1,2, dithiolano-3-pentanoico- reduce el EO consecuente con la administración de una DRF (Thirunavukkarasu y col., 2003) e incluso mejora la IR sistémica (Thirunavukkarasu y Anuradha, 2004). El  $\alpha$ -AL es un antioxidante mitocondrial que se encuentra en células animales y vegetales. Se absorbe fácilmente a nivel intestinal y desde allí se transporta por el torrente sanguíneo a otros tejidos donde se absorbe a nivel celular (Figura 7). En el interior de la célula se convierte a su forma reducida, el ácido dihidrolipoico (Cakatay y col., 2000).



*Figura 7:* estructura molecular del  $\alpha$ -AL

El bajo potencial redox del par conjugado AL/ácido dihidrolipoico (-0,29 V) lo convierte en un poderoso agente reductor, al compararlo con el par conjugado glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG). Esto indica que el ácido dihidrolipoico es un agente reductor más potente que el GSH (Jocelyn, 1967).

A su vez, su naturaleza hidrofóbica le permite transportarse fácilmente a través de las membranas biológicas, mientras que su naturaleza ditiólica es la responsable de su alta reactividad frente a los ROS, lo que le permite cumplir un rol central en el establecimiento y mantenimiento del sistema de defensa antioxidante, al secuestrar ROS efectivamente (Haenen y Bast, 1991; Yan y col., 1996) y regenerar la forma reducida de los antioxidantes (Smith y col., 2004). Por ejemplo, el ácido dihidrolipoico es capaz de reciclar vitamina E al reducir GSSG (Bast y Haenen, 1990; Maitra y col., 1995), el cual luego reduce los radicales de la vitamina E. El tratamiento con  $\alpha$ -AL (10-100  $\mu$ M) induce un incremento del 30 al 70% del contenido celular de GSH (Busse y col., 1992; Evans y Goldfine, 2000; Han y col., 1997; Obrosova y col., 2000; Thirunavukkarasu y col., 2004).

Entre las propiedades del  $\alpha$ -AL y del ácido dihidrolipoico también podemos citar su capacidad para secuestrar metales como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  (Scott y col., 1994),  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  (Sigel y col., 1978).

Asimismo, el  $\alpha$ -AL actúa como cofactor de complejos enzimáticos mitocondriales que participan en el metabolismo oxidativo tales como  $\alpha$ -

cetodeshidrogenasas (complejos piruvato deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa) y sistema de clivaje de glicina (Reed, 1998; Shay y col., 2009; Wollin y Jones, 2003). Los primeros están involucrados en la oxidación de piruvato, el ciclo del ácido cítrico y la degradación y síntesis de aminoácidos, mientras que el segundo es un complejo multienzimático específico de la matriz mitocondrial de los hepatocitos que cataliza la oxidación de glicina.

Estudios clínicos demostraron que el  $\alpha$ -AL suministrado en dosis de 600 mg/día reduce los niveles plasmáticos de lípidos peroxidados (Borcea y col., 1999), mejora el metabolismo de glucosa, previene la glicación proteica (Packer y col., 1995) y tiene propiedades insulino-sensibilizantes en pacientes con DMT2 (Evans y Goldfine, 2000; Evans y col., 2004; Jacob y col., 1995; Kim y col., 2004; Lee y col., 2005). Asimismo se reportan efectos beneficiosos en la prevención, como en el tratamiento de DMT2 e IR (Androne y col., 2000; Haak y col., 2000; Henriksen, 2006; Obrosova y col., 1998; Ruhnau y col., 1999), así como en neuropatía diabética (Packer y col., 2001) debido a su acción antioxidante y también al mejorar la circulación en los pequeños vasos sanguíneos que irrigan el tejido nervioso (Haak y col., 2000). Finalmente, es efectivo en disminuir el EO inducido por drogas (Amudha y col., 2006), diferentes dietas (Thirunavukkarasu y col., 2004), edad (Arivazhagan y col., 2002) y ejercicio físico (Khanna y col., 1999).

El AL se sintetiza de forma endógena a partir de ácido octanoico por acción de la ácido lipoico sintetasa (LASY), cuya localización principal es la mitocondria (Morikawa y col., 2001). Es importante destacar que la expresión génica de LASY disminuye en modelos animales de diabetes y obesidad, como ratones *ob/ob* (Padmalayan y col., 2009), lo cual conlleva a bajos niveles endógenos de AL. Este hecho podría provocar un desbalance redox y, en consecuencia, inflamación y disfunción mitocondrial, dos características de la diabetes (Padmalayan y col., 2009). Por otro lado, la exposición de células a citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ ) o a altas concentraciones de glucosa

inducen una disminución en los niveles de ARNm de LASY (Padmalayan y col., 2009).

La suplementación exógena de  $\alpha$ -AL es capaz de restituir totalmente la actividad de SOD, catalasa, glutatión reductasa (GR) y GPx de un modo dosis dependiente (Padmalayan y col., 2009; Thirunavukkarasu y col., 2004). A su vez, induce la expresión de LASY, hecho que sugiere que la administración exógena de  $\alpha$ -AL promueve su síntesis endógena (Maritim y col., 2003a; Padmalayan y col., 2009).

Diversas investigaciones emplean distintas dosis de  $\alpha$ -AL, que van desde 10 a 100 mg/kg corporal en animales de experimentación en estudios de diabetes, sin reportar efectos tóxicos (Maritim y col., 2003b). Luego de 4 horas de administración oral o intraperitoneal de  $\alpha$ -AL marcado radioactivamente, la máxima radioactividad se observó en el hígado, y a las 24 horas posteriores, en músculo esquelético (Harrison y McCormick, 1974), lo cual demuestra que el hígado tiene una gran capacidad para absorber y acumular  $\alpha$ -AL.

Entre los efectos beneficiosos detectados a este nivel se pueden citar: reducción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) hepáticas (Khanna y col., 1997; Thirunavukkarasu y col., 2004), mejora de la sensibilidad a la insulina (Cummings y col., 2010; Lee y col., 2005; Song y col., 2005), aumento de la absorción y metabolismo de glucosa (Estrada y col., 1996; Jacob y col., 1996; Moini y col., 2002; Saengsirisuwan y col., 2004; Singh y Bowman, 1970; Thirunavukkarasu y col., 2004), en parte debido al incremento en la translocación a la membrana plasmática de los transportadores GLUT-1 y GLUT-4 (Estrada y col., 1996), con mejora de los niveles plasmáticos de glucosa e insulina (Henriksen, 2006; Huong e Ide, 2008; Thirunavukkarasu y col., 2004).

Se han registrado además, otros efectos del  $\alpha$ -AL, como reducción de la expresión génica del factor de transcripción SREBP 1c (responsable de la regulación de la expresión génica de enzimas lipogénicas) (Horton y col.,

2002) y de la expresión génica y actividad enzimática de FAS (Huong e Ide, 2008; Lee y col., 2006a), disminución dosis dependiente de los niveles plasmáticos de TG y NEFA (Thirunavukkarasu y col., 2004) y del contenido hepático de TG y colesterol (Huong e Ide, 2008; Ford y col., 2001; Song y col., 2005; Yi y Maeda, 2006). De estos estudios se puede inferir que el principal efecto del  $\alpha$ -AL es la disminución de la lipogénesis hepática, reduciendo así la acumulación de lípidos a nivel tisular y plasmático.

Por otro lado, el tratamiento con  $\alpha$ -AL en ratas diabéticas Goto-Kakizaki reduce el contenido de proteínas carboniladas y mejora la actividad de enzimas del sistema de defensa antioxidante como SOD, glutatión S-transferasa y NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1 (Hao y col., 2011). Asimismo, se ha registrado que la administración de  $\alpha$ -AL retrasa el inicio de la diabetes en ratas UCD-T2M (Cummings y col., 2010).

En resumen, la administración de  $\alpha$ -AL normalizaría el medioambiente metabólico en respuesta al aumento del depósito de glucosa. De este modo, atenuaría o inhibiría aquellas complicaciones de la DMT2 relacionadas con la presencia de ROS y la glicosilación de proteínas (Ziegler y col., 1999). Por ello, la administración exógena de  $\alpha$ -AL sería una alternativa terapéutica para el tratamiento de esta patología, particularmente en estadios tempranos de su desarrollo.

## **1.9. Hipótesis de trabajo y objetivos**

La administración de una DRF a ratas normales induce rápidamente alteraciones metabólicas (hipertrigliceridemia y TGA), endocrinas (IR, hiperinsulinemia e hiperleptinemia), cambios en el metabolismo hepático de glúcidos y lípidos e incremento de la producción de ROS (Alzamendi y col., 2009; Castro y col., 2011; Francini y col., 2009; 2010; Rebolledo y col., 2008). Nuestra hipótesis de trabajo es que el hígado afronta inicialmente la sobrecarga metabólica inducida por una DRF, la cual genera un estado de EO. La secuencia patogénica propuesta sería: el aporte exagerado de fructosa al hígado promovería un estado de EO a nivel local; el EO induciría cambios metabólicos tendientes a disminuir el flujo de sustratos oxidables hacia la mitocondria y el consecuente EO, y una respuesta adaptativa inmuno-metabólica a dicha injuria. Si la secuencia de eventos causales postulada fuese correcta, los cambios descritos serían secuenciales (EO→cambios metabólicos→cambios inflamatorios) y la administración de un agente capaz de reducir el EO podría revertirlos.

En función de lo expuesto, los **objetivos generales** de la presente Tesis fueron:

- a) desarrollar un modelo de IR y EO inducido por administración de una DRF que simule lo ocurrido a nivel poblacional;
- b) estudiar en ese modelo la IR, el grado de EO, marcadores de inflamación y mecanismos involucrados en la adaptación metabólica hepática frente a la sobrecarga de fructosa y a los cambios hormonales generados;
- c) verificar la posible remisión del EO, la IR y los cambios metabólicos, endocrinos e inflamatorios hepáticos mediante la administración de  $\alpha$ -AL.



Los **objetivos específicos** fueron estudiar en el hígado de ratas normales control (C) y con IR y TGA inducida por administración de DRF (F) y luego de la administración de  $\alpha$ -AL (CL y FL):

- a) niveles circulantes de glucosa, TG, TBARS e insulina;
- b) tolerancia a la glucosa (administrada por vía oral);
- c) marcadores de EO tales como el grado de peroxidación lipídica (TBARS), contenido de GSH, de carbonilos en proteínas y cambios en la expresión génica, contenido proteico y actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, SOD y GR);
- d) marcadores de inflamación tales como expresión génica y proteica de TNF $\alpha$ , Ik $\beta$  $\alpha$ , NFk $\beta$  y COX2;
- e) niveles de expresión proteica y estado de fosforilación del RI y de mediadores intracelulares de insulina (IRS1, IRS2 y PI3K);
- f) expresión génica, contenido proteico, distribución celular y actividad de GQ;
- g) expresión génica y proteica de PFK-2 y su papel modulador de la actividad de GQ;
- h) canalización preferencial de la glucosa hacia diferentes vías metabólicas (glucogenogénesis, glucólisis, ciclo fútil de la glucosa y vía de las pentosas, depósito hepático de TG).

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

---

## **2.1. Reactivos empleados**

$\alpha$ -AL (Megatioc ®) de Laboratorio John Martin S.R.L., Argentina; fructosa de Laboratorios Cicarelli, Argentina; isofluorano (Forane ®) de Abbot; TRIZOL, agua con DEPC, retrotranscriptasa SuperScript III, Platinum Taq DNA Polimerasa y cebadores de Invitrogen, EE.UU.; SYBG Green de Molecular Probes, EE.UU.; membranas de PVDF, estándar de peso molecular de proteínas Precision Plus Protein Standards y Bio-Rad protein assay de Bio-rad Laboratories, EE.UU.; Tween 20 de Promega Corporation, EE.UU.;  $\beta$  mercaptoetanol de J.T. Baker, Japón. Procedencia de los anticuerpos 1º: anti-catalasa de Rockland, Gilbertsville, Pennsylvania, EE.UU.; anti-glucoquinasa (anti-GQ) cedido por Dr. Mark Magnusson, Vanderbilt University, Nashville, EE.UU.; anti-sustrato del receptor de insulina 1 (anti-IRS1), anti-sustrato del receptor de insulina 2 (anti-IRS2) y anti-fosfatidilinositol-3-quinasa (anti-PI3K) de Upstate, Millipore, EE.UU.; anti-fosfofructoquinasa 2 (anti-PFK2) y anti-superóxido dismutasa 1 (anti-SOD1) cedidos por el Prof. Sigurd Lenzen, Hannover Biomedical Research School, Hannover, Alemania; anti-cilooxigenasa 2 (anti-Cox2) de Cayman Chemical; anti-glutatión reductasa (anti-GR), anti-fructoquinasa (anti-FQ), anti-I $\kappa$  $\beta$ , anti-p22<sup>phox</sup>, anti-receptor de peroxisomas activado por proliferación alpha (anti-PPAR $\alpha$ ), anti-receptor de peroxisomas activado por proliferación gamma (anti-PPAR $\gamma$ ), anti-receptor de peroxisomas activado por proliferación delta (anti-PPAR $\delta$ ), anti-superóxido dismutasa 2 (anti-SOD2), anti-factor de necrosis tumoral alpha (anti-TNF $\alpha$ ), anti-proteína desacoplante mitocondrial 2 (anti-UCP2), anti-receptor de insulina subunidad  $\beta$  (anti-RI) y anti-fosfo-Tirosina (anti-pTyr) de Santa Cruz Biotechnology, EE.UU. Procedencia de los anticuerpos 2º: anti-cabra, anti-cabra peroxidasa-conjugado, anti-oveja, anti-conejo, anti-conejo peroxidasa-conjugado y anti-ratón peroxidasa-conjugado son de Santa Cruz Biotechnology, EE.UU. y anti-pollo peroxidasa-conjugado de Dianova GmbH, Alemania. La estreptavidina peroxidasa-conjugado de Perkin Elmer, EE.UU. El resto de los reactivos fueron provistos por Sigma-Aldrich, EE.UU.

## **2.2. Grupos experimentales**

Se emplearon ratas Wistar macho adultas (180-200 g de peso corporal) que se mantuvieron en tratamiento durante 21 días divididas en 4 grupos experimentales: C: dieta comercial estándar y agua corriente *ad libitum*; CL:



tratamiento igual al anterior más inyección intraperitoneal de  $\alpha$ -AL (35 mg/kg peso corporal/día), durante los últimos 5 días de tratamiento; F: dieta comercial estándar con el agregado de fructosa al 10% en el agua de bebida; y FL: tratamiento igual al anterior más inyección intraperitoneal de  $\alpha$ -AL (35 mg/kg peso corporal/día) durante los últimos 5 días de tratamiento. La dosis de  $\alpha$ -AL así como la vía de aplicación y el tiempo de tratamiento se eligieron después de ensayar diferentes condiciones. Se seleccionó aquella dosis y vía que aseguraron la supervivencia del 100% de los animales al final del tratamiento. Los animales se mantuvieron en un ambiente con temperatura y humedad constantes ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 50% humedad) y ciclos de luz/oscuridad controlados de 12 horas cada uno. Se registró semanalmente el peso corporal y la ingesta de comida, mientras que el control de bebida se realizó 3 veces por semana.

Transcurridos los 21 días de tratamiento, los animales se anestesiaron por inhalación con isofluorano y se tomaron muestras de sangre del plexo retroorbitario. Luego se sacrificaron por dislocación cervical y se tomaron muestras de hígado, las cuales fueron almacenadas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el momento de su procesamiento.

### 2.3. Determinación de parámetros séricos

Para la obtención de suero, las muestras de sangre se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se determinaron los siguientes parámetros:

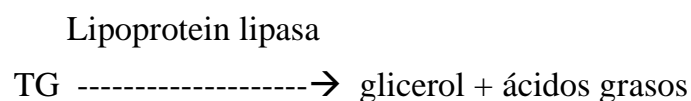
■ **Glucemia:** se midió por el método de glucosa-oxidasa GOD-PAP (Roche, Mannheim, Alemania) empleando tiras reactivas One Touch (Johnson & Johnson, EE.UU.). Los resultados se expresaron como mg glucosa/dl de suero.

■ **Insulinemia:** la insulina se determinó por radioinmunoanálisis (Herbert y col., 1965) utilizando el anticuerpo anti-insulina y un estándar de insulina de rata (Kit de Linco Research Inc., IN, EE.UU.). Los valores se expresaron como ng insulina/ml suero.

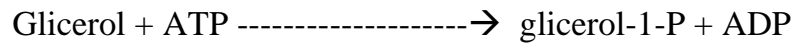
■ **TBARS séricos:** se siguió el protocolo propuesto por Yagi (1976). A 150 µl de plasma se adicionaron 350 µl de agua destilada. A 500 µl de dicha solución se adicionaron 4 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,08 N y 500 µl de ácido fosfotúngstico al 10%. Se agitó y dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos, luego se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Se resuspendió el pellet en 4 ml de agua destilada y se adicionó 1 ml de ácido tiobarbitúrico al 0,70% en agua destilada:ácido acético glacial (1:1). Se calentaron las muestras a 95°C durante 60 minutos. Luego se dejó enfriar y se adicionaron 3 ml de butanol, se agitó y centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió la capa orgánica a un nuevo tubo y se midió por espectrofotómetro a 535 nm. Los resultados se expresaron en picomoles/mg proteínas séricas.

■ **Trigliceridemia:** se midió mediante un método enzimático (kit TG Color GPO/PAP AA; Laboratorios Wiener, Argentina).

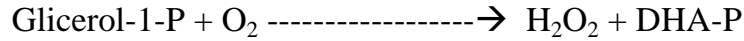
Fundamento del método:



Glicerol quinasa



Glicerol fosfato oxidasa



Peroxidasa

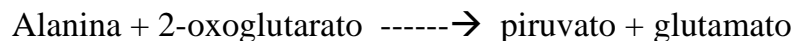


A 10 µl de suero se agregó 1 ml de reactivo de trabajo. La mezcla se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia por espectrofotometría a 505 nm. La trigliceridemia se calculó en relación al estándar provisto en el kit aplicando la siguiente fórmula: (absorbancia de la muestra corregida con el blanco x 2 g/l)/absorbancia del estándar. Los valores se expresaron como mg de TG/dl de suero.

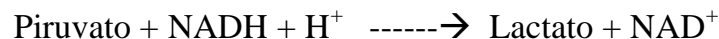
■ **ALT:** se determinó empleando el kit Alanina aminotransferasa ALT/GPT (Biosystems S.A., España). La ALT cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al 2-oxoglutarato, formando piruvato y glutamato. La concentración catalítica se determina empleando la reacción acoplada de la LDH a partir de la velocidad de desaparición del NADH medido a 340 nm.

Fundamento del método:

ALT



LDH

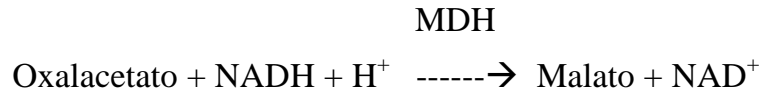


Para ello, a 4 ml de reactivo A (Tris 150 mM, L-alanina 750 mM, lactato deshidrogenasa > 1350 U/l, pH 7,3) se agregó 1 ml de reactivo B (NADH 1,3 mM, 2-oxoglutarato 75 mM, NaOH 148 mM y azida sódica 9,5

g/l). Un ml de esta mezcla se incubó con 50 µl de suero a 37°C durante 1 minuto y se midió la absorbancia a 340 nm cada 3 minutos. La concentración de ALT se calculó según la siguiente fórmula: (variación de la absorbancia por minuto x volumen total de la reacción x 10<sup>6</sup>) / (coeficiente de absorción molar del NADH x 1 cm de paso de luz de la cubeta x volumen de muestra). Los resultados se expresaron como U de ALT/l de suero.

■ **AST:** se determinó con el kit Aspartato aminotransferasa AST/GPT (Biosystems S.A., España). La AST cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al 2-oxoglutarato, formando oxalacetato y glutamato. La concentración catalítica se determina empleando la reacción acoplada de la MDH a partir de la velocidad de desaparición del NADH medido a 340 nm.

Fundamento del método:



Para ello, a 4 ml de reactivo A (Tris 121 mM, L-aspartato 362 mM, malato deshidrogenasa > 460 U/l, lactato deshidrogenasa > 660 U/l, NaOH 255 mM, pH 7,8) se agregó 1 ml de reactivo B (NADH 1,3 mM, 2-oxoglutarato 75 mM, NaOH 148 mM y azida sódica 9,5 g/l). Los resultados se expresaron como U de AST/l de suero.

■ **Modelo de determinación homeostático de IR (HOMA-IR):** este índice de sensibilidad a la insulina se calcula empleando los valores obtenidos de glucemia e insulinemia, aplicando la siguiente fórmula: insulinemia (µU/ml) x glucemia (nmol/l) / 22,5. Relacionado con este índice también se calculó la función β (HOMA-β) a partir de la fórmula: insulinemia (µU/ml) x 20 / glucemia (nmol/l) – 3,5 (Matthwes y col., 1985).

■ **Indice de sensibilidad hepática a la insulina (ISHI):** este índice se determina empleando los valores obtenidos de glucemia e insulinemia y aplicando la siguiente fórmula:  $k/\text{glucemia plasmática de ayuno} \times \text{insulina plasmática de ayuno}$  donde  $k=22,5 \times 18$  (Matsuda y DeFronzo, 1999).

#### **2.4. Curva de tolerancia oral a la glucosa**

Seis animales de cada uno de los grupos experimentales se emplearon para realizar la curva de tolerancia oral a la glucosa. Con un ayuno previo de 12 horas, los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina 80 mg/kg y midazolán 5 mg/kg y se les suministró por vía oral 1,1 g glucosa por kg de peso corporal (en solución salina al 18%). Se obtuvieron muestras de sangre del plexo retroorbital a los 0, 30, 60 y 120 minutos luego de la sobrecarga y con ellas se determinó la glucemia por el método previamente descrito. Con los valores obtenidos se calcularon las correspondientes áreas bajo la curva empleando el programa Origin Pro 7.5.

#### **2.5. Expresión génica mediante PCR en tiempo real (qPCR)**

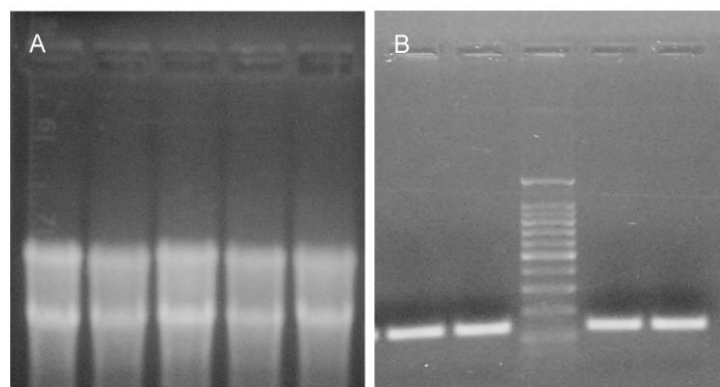
Para la determinación de expresión génica se aisló ARN total de muestras de hígado utilizando el reactivo TRIzol según el método de Chomczynsky y Sacchi (1987). Para ello se emplearon trozos de hígado (100-150 mg) a los cuales se adicionó 1 ml de TRIzol en tubos plásticos estériles. Las muestras se homogeneizaron con un microhomogeneizador ultraturrax y posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se le agregaron 200 µl de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1 v/v). Tras 3 minutos de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Al sobrenadante obtenido se le adicionaron 500 µl de isopropanol frío y la mezcla se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y luego a -20°C por 16 horas. Posteriormente, las muestras se



centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos, a 4 °C. Al precipitado obtenido se le adicionó 1 ml de etanol 75% para el lavado del mismo. La mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos a 4°C y el ARN resultante (precipitado) se resuspendió en 50 µl de agua con DEPC y se congeló a -80°C hasta su utilización.

La integridad del ARN obtenido se verificó mediante electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa 1%-formaldehído 5%, verificándose la presencia de las bandas correspondientes al ARNr de 28S y 18S (Figura 8). Para determinar la concentración y pureza del mismo se midió la absorbancia de las muestras a 260 nm/280 nm en un espectrofotómetro Shimadzu. La lectura de una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a una concentración de ARN de 0,04 µg/µl, por lo que su concentración en la muestra se determina empleando la siguiente fórmula:  $\text{ARN muestra} = \text{Abs}_{260} \times \text{dilución} \times 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

La relación de absorbancias a 260/280 nm también es un indicador de pureza del ARN. Valores entre 1,6 y 2 para esta relación indican ARN libre de contaminación con proteínas o restos de fenol de los reactivos de extracción. Valores mayores indican contaminación con sales.



**Figura 8:** A: electroforesis de ARN ribosómico 28S y 18S. B: electroforesis correspondiente al amplicón de  $\beta$  actina y un estándar de peso molecular como referencia

A partir del ARN total aislado se obtuvo el ADNc mediante retrotranscripción (RT-PCR) utilizando la enzima retrotranscriptasa SuperScript III. La eficiencia de este proceso se verificó mediante PCR convencional utilizando cebadores para  $\beta$ -actina (amplicón de 138 pb). La visualización de la correspondiente banda se efectuó sometiendo el producto de la reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Figura 8).

El ADNc se empleó para la cuantificación del ARNm mediante qPCR (Mini Opticon real-time PCR detection system, Bio-Rad Laboratories, EE.UU.), usando cebadores específicos para cada gen en estudio (360 nM concentración final), Platinum Taq DNA Polimerasa y SYBG Green como fluoróforo. Dicha sustancia es un reactivo con la capacidad del unirse al ADN doble hebra y por lo tanto útil para la cuantificación del mismo.

Los cebadores empleados se diseñaron usando las secuencias de referencia presentes en la base de datos de GenBank. En la siguiente tabla se detallan los números de identificación de dichas secuencias y los cebadores diseñados.

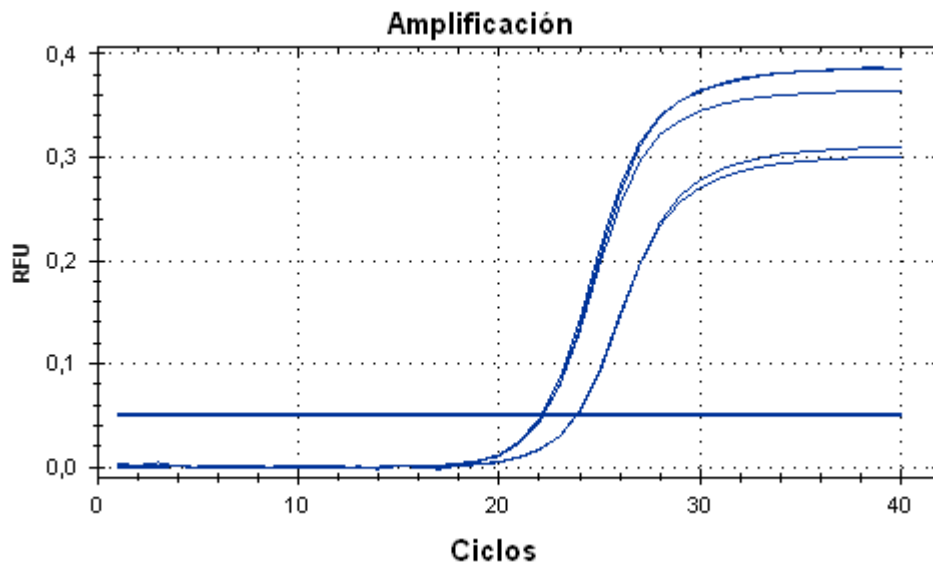
**Tabla 1:** secuencias de cebadores empleados en qPCR. Se detalla el número de secuencia de GenBank que se empleó para su diseño

<b>Gen</b>	<b>Número de identificación en GenBank</b>	<b>Secuencias</b>
$\beta$ actina	NM_031144.2	FW 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3' RV 5'-CGATAGTGATGACCTGACCGT-3'
Catalasa	NM_012520.1	FW 5'-CCTCAGAAACCCGATGTCCTG-3' RV 5'-GTCAAAGTGTGCCATCTCGTCG-3'
ChREBP	NM_133552.1	FW 5'-CAGATGCGGGACATGTTTGA-3' RV 5'-AATAAAGGTCGGATGAGGATGCT-3'
CPT-1	NM_031559.2	FW 5'-GGGCGGTACTTCAAGGTCTGG-3' RV 5'-GTCTGCCGACACTTTGCCA-3'
FAS	NM_017332.1	FW 5'-GTCTGCAGCTACCCACCCGTG-3' RV 5'-CTTCTCCAGGGTGGGGACCAG -3'
FQ	NM_031855.3	FW 5'-ACGGATCGCAGGTGCCTAT-3' RV 5'-AGCACAGTGCAGGAGTTGGA-3'
Gl-6-Pasa	NM_013098.2	FW 5'-GATCGCTGACCTCAGGAACGC-3' RV 5'-AGAGGCACGGAGCTGTTGCTG-3'

GI-6-PDH	NM_017006.2	FW 5'-TTCCGGGATGGCCTTCTAC-3' RV 5'-TTTGCGGATGTCATCCACTGT-3'
gp91 <sup>phox</sup>	NM_023965.1	FW 5'-CCAGTGTGTCGGAATCTCCT-3' RV 5'-ACACCACTCCACGTTGAACA-3'
GPAT	NM_017274.1	FW 5'-GACGAAGCCTTCCGAAGGA-3' RV 5'-GACTTGCTGGCGGTGAAGAG-3'
GQ	NM_012565.1	FW 5'-GTGTACAAGCTGCACCCGA-3' RV 5'-CAGCATGCAAGCCTTCTTG-3'
GR	NM_030826.3	FW 5'-TCCACCGTGTATGCCTTCTCG-3' RV 5'-CGACATTCTCAATGAGCAGCACC-3'
IL1 $\beta$	NM_031512.2	FW 5'-ACAAGGAGAGACAAGCAACGAC-3' RV 5'-TCTTCTTTGGGTATTGTTTGGG-3'
IRS1	NM_012969	FW 5'-TGTGCCAAGCAACAAGAAAG-3' RV 5'-ACGGTTTCAGAGCAGAGGAA-3'
IRS2	NM_001168633.1	FW 5'-CTACCACTGAGCCCAAGAG-3' RV 5'-CCAGGGATGAAGCAGGACTA-3'
LASY	NM_001012037.1	FW 5'-GGAAGCCCGATGTCCAAACA-3' RV 5'-TGGAGGGGGATTCTTGCCG-3'
NF $\kappa$ $\beta$	NM_199267.2	FW 5'-CATGCCAACGCCCTCTTCGA-3' RV 5'-TGTCCCCGTTCTCATCCTGCAC-3'
p22 <sup>phox</sup>	NM_024160.1	FW 5'-CACGCAGTGGTACTTTGGTG-3' RV 5'-CACGGACAGCAGTAAGTGA-3'
PAI-1	NM_012620.1	FW 5'-CCACGGTGAAGCAGGTGGACT-3' RV 5'-TGCTGGCCTCTAAGAAGGGG-3'
PEPCK	NM_198780.3	FW 5'-TGCCCCAGGAAGTGAGGAAG-3' RV 5'-GGTCAGTGAGAGCCAGCCAAC-3'
PFK-2	NM_012621.4	FW 5'-CGATCTATCTACCTATGCCGCCAT-3' RV 5'-ACACCCGCATCAATCTCATTCA-3'
PK	NM_012624.3	FW 5'-TATGGCGGACACCTTCCTGGA-3' RV 5'-CATGGGAGAAGTTGAGTCGTGC-3'
PPAR $\alpha$	NM_013196.1	FW 5'-CACCTCTCTCCAGCTTCCA-3' RV 5'-GCCTTGTCCCCACATATTCG-3'
PPAR $\delta$	NM_013141.2	FW 5'-AACGAGATCAGCGTGCATGTG-3' RV 5'-TGAGGAAGAGGCTGCTGAAGTT-3'
PPAR $\gamma$	NM_001145366.1	FW 5'-ATGGAGCCTAAGTTTGAGTTTGCT-3' RV 5'-GGATGTCCTCGATGGGCTTCA-3'
SOD1	NM_017050.1	FW 5'-GTGCAGGGCGTCATTCCTTC-3' RV 5'-TGCCTCTTTCATCCGCTGGA-3'
SOD2	NM_017051.2	FW 5'-ACCGAGGAGAAGTACCACGA-3' RV 5'-TAGGGCTCAGGTTTGTCCAG-3'
SREBP 1c	XM_213329.5	FW 5'-TTTCTTCGTGGATGGGGACT-3' RV 5'-CTGTAGATATCCAAGAGCATC-3'
TNF $\alpha$	NM_012675.3	FW 5'-GGCATGGATCTCAAAGACAACC-3' RV 5'-CAAATCGGCTGACGGTGTG-3'
UCP2	NM_019354.2	FW 5'-GAGAGTCAAGGGCTAGCGC-3' RV 5'-GATGCCTGCATGCTCTGAG-3'

El programa estándar utilizado para la cuantificación de la expresión génica fue: 3' a 95°C, 39 ciclos de (30'' a 95°C, 45'' a 65°C, 30'' a 72°C) y 10' a 72°C. En algunos casos se realizaron algunas modificaciones para mejorar la eficiencia de amplificación. En la Figura 9 se pueden observar dos curvas de amplificación correspondientes a dos genes distintos.

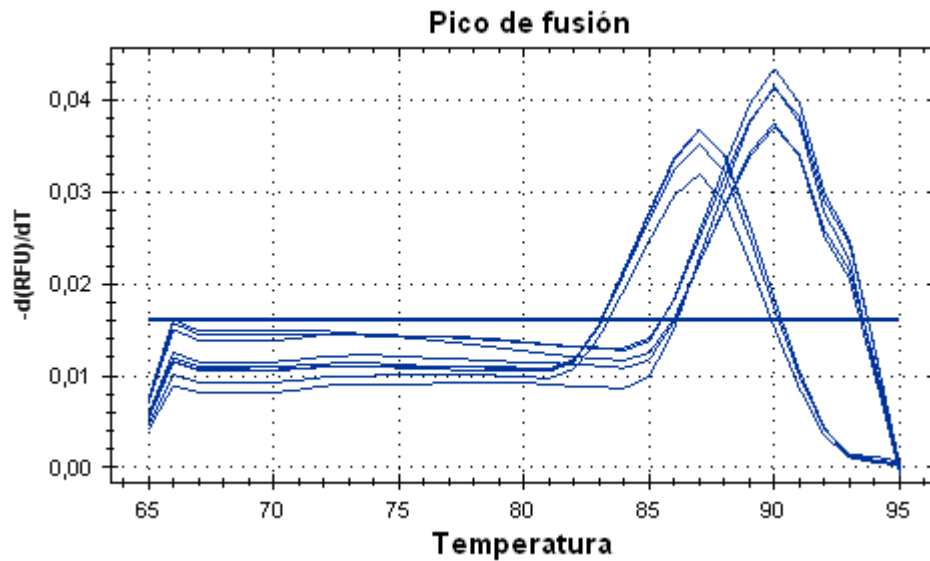
Los datos se muestran como expresión relativa luego de su normalización respecto al gen de referencia  $\beta$  actina empleando el software Qgene96 y LineRegPCR (Muller y col., 2002).



**Figura 9:** curvas de amplificación de dos genes distintos en qPCR, medidas por fluorescencia. RFU: unidades relativas de fluorescencia

La especificidad de los cebadores empleados se verificó mediante la realización de las curvas de fusión (“*melting*”) de los productos amplificados correspondientes a la qPCR previamente descrita. Dichas curvas se obtuvieron calentando la muestra desde 55°C a 95°C y registrando la fluorescencia cada 0,5°C. El incremento de la temperatura genera la ruptura o desnaturalización de la estructura de la doble hebra de ADN y en esas condiciones varía la intensidad de la fluorescencia emitida por el fluoróforo SYBR Green I. Si se grafica la variación de intensidad en función de la

temperatura obtenemos un registro, donde la presencia de un pico corresponde a la temperatura de fusión del fragmento. La presencia de más de un pico implica la presencia de más de un producto de amplificación y por lo tanto inespecificidad de los cebadores empleados. En la Figura 10 se presentan dos curvas de fusión pertenecientes a dos amplicones diferentes.



**Figura 10:** curvas de fusión de dos genes distintos en qPCR, medidas por fluorescencia

## **2.6. Expresión proteica mediante Western blot**

Las muestras de hígado se homogeneizaron en buffer PBS I, en relación tejido/buffer 1+3. Dicho buffer tiene la siguiente composición:

*Sales:*            NaCl 137 mM  
                       KCl 2,7 mM  
                       Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM  
                       KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM

*Inhibidores:* PMSF 0,1 mM  
                       Benzamidina 0,1 mM

DTT 2 mM

Aprotinina 4 µg/ml

Sacarosa 0,3 M

Posteriormente las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C. La concentración proteica del sobrenadante se midió según Bradford (1976) empleando el reactivo Biorad protein assay. Las muestras se congelaron a -80°C, hasta el momento de uso.

Para continuar el proceso, a cada muestra se le adicionó buffer Laemmli con β mercaptoetanol en relación 1:1 y se calentó a 95°C durante 10 minutos (para desnaturalizar las proteínas). Luego se sembraron en geles de poliacrilamida de diferente densidad, de acuerdo al peso molecular de la proteína en estudio.

Una vez realizada la siembra de las muestras, se sometieron a electroforesis en gel (20 mA constante). Finalizada la misma, las proteínas se transfirieron por el sistema de transferencia semi-húmeda a una membrana de PVDF a 10 V constantes durante 30 minutos, empleando buffer de transferencia (Tris base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 1,3 mM, 20% metanol, pH 9,2). Las membranas se incubaron en presencia de leche libre de ácidos grasos al 10% en buffer TBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5) con Tween 20 0,1% durante 16 horas a 4°C, con el objeto de bloquear los sitios inespecíficos en la membrana.

Finalizado el bloqueo las membranas se lavaron (3 lavados de 10 minutos cada uno) con TBS-Tween 20 0,1% y luego se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS-Tween 20 0,1% y 3% BSA el tiempo necesario (ver en la Tabla 2 las condiciones particulares para cada anticuerpo). Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween 20 0,1% y luego se incubaron con el anticuerpo

secundario correspondiente, preparado según fue detallado para el anticuerpo primario.

Tras realizar tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween 20 0,1%, se efectuó el revelado de la muestra y en consecuencia de la proteína correspondiente utilizando 10 mg de DAB diluida en 20 ml de TBS, 10  $\mu$ l de  $\text{NiCl}_2$  10% y 15  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (v/v) (Figura 11). La reacción se detuvo con agua destilada. En los casos especificados el revelado se efectuó mediante ECL, empleando el kit Amersham<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup> Western blotting analysis system (GE Healthcare, UK).



**Figura 11:** imagen de un Western blot revelado con DAB. A la izquierda se observa estándar de peso molecular utilizado como referencia, la banda rosa superior corresponde a 75 kDa y las azules siguientes a 50 y 37 kDa de arriba hacia abajo

Las membranas se secaron, se escanearon y las bandas se cuantificaron empleando el software Gel-Pro Analyser.

En la tabla siguiente se detallan el peso molecular de la proteína a detectar, la cantidad de proteína sembrada ( $\mu$ g prot), la densidad del gel (%), los anticuerpos empleados, las diluciones de uso, tiempos de incubación (T) en minutos (m) u horas (h) y el tipo de revelado (R) para cada proteína en particular.

Las incubaciones de 16 horas con anticuerpos primarios se realizaron a 4°C. El resto de los anticuerpos se incubaron a temperatura ambiente.

**Tabla 2:** se detallan las condiciones de uso de los anticuerpos empleados para Western blot

<b>Proteína (PM kDa)</b>	<b>µg prot</b>	<b>Gel %</b>	<b>Anticuerpo 1°</b>	<b>T (h)</b>	<b>Anticuerpo 2°</b>	<b>T (m)</b>	<b>R</b>
Catalasa (60)	50	10	Anti-catalasa 1:5000	2	Anti-conejo peroxidasa 1:2000	60	DAB
COX2 (72)	50	10	Anti-COX2 1:1000	16	Anti-conejo peroxidasa 1:5000	60	ECL
FQ (33)	100	12,5	Anti-FQ 1:1000	16	Anti-cabra-peroxidasa 1:10000	90	ECL
GQ (60)	20	10	Anti-GQ 1:2000	1,5	Anti-oveja 1:2000/ estreptavidina- peroxidasa 1:2000	30 30	DAB
GR (65)	100	10	Anti-GR 1:50	2,5	Anti-conejo 1:2000/ estreptavidina peroxidasa 1:2000	30 30	DAB
Iκβα (40)	50	10	Anti- Iκβα 1:1000	16	Anti-conejo peroxidasa 1:20000	60	ECL
IRS1 (165)	20	6	Anti-IRS1 1:2000	16	Anti-conejo- peroxidasa 1:20000	60	ECL
IRS2 (180)	150	6	Anti-IRS2 1:2000	16	Anti-conejo- peroxidasa 1:20000	60	ECL
PFK-2 (58)	200	10	Anti-PFK-2 1:10000	2	Anti-pollo-peroxidasa 1:400000	60	DAB
p22 <sup>phox</sup> (22)	100	12,5	Anti- p22 <sup>phox</sup> 1:200	2,5	Anti-conejo- peroxidasa 1:10000	90	DAB
PI3K (85)	50	7,5	Anti-PI3K 1:6000	1,5	Anti-conejo- peroxidasa 1:10000	90	ECL
PPARα (55)	150	10	Anti-PPARα 1:100	16	Anti-conejo- peroxidasa 1:20000	60	ECL
PPARγ (67)	150	10	Anti-PPARγ 1:100	16	Anti-conejo- peroxidasa 1:20000	60	ECL
PPARδ (60)	50	10	Anti- PPARδ 1:100	16	Anti-conejo- peroxidasa 1:20000	60	ECL
RI (95)	50	10	Anti-RI 1:2000	16	Anti-conejo- peroxidasa 1:20000	60	ECL



SOD1 (30)	100	12,5	Anti-SOD1 1:3000	3	Anti-conejo- peroxidasa 1:10000	60	DAB
SOD2 (25)	50	12,5	Anti-SOD2 1:1000	1,5	Anti-conejo 1:1000/ estreptavidina- peroxidasa 1:2000	30 30	DAB
TNF $\alpha$ (17)	150	12,5	Anti- TNF $\alpha$ 1:1000	16	Anti-cabra-peroxidasa 1:10000	120	ECL
UCP2 (32)	100	12,5	Anti-UCP2 1:500	16	Anti-cabra 1:1000/ estreptavidina- peroxidasa 1:2500	60 60	DAB

Para el caso de pTyr: las muestras se inmunoprecipitaron con el anticuerpo 1° anti-pTyr, en buffer de solubilización (1% Tritón-X100, Tris base 100 mM pH 7,4, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 100 mM, NaF 100 mM, EDTA 10 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 10 mM, PMSF 2 mM y 0,1 g/l de aprotinina) durante 16 horas en homogeneizador giratorio a 4°C. Posteriormente se adicionó proteína sefarosa A en buffer de lavado (Tris base 50 mM, 1% Tritón-X100 y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7,4) y se incubó en el homogeneizador a 4°C durante 2 horas más. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 minuto, se descartó el sobrenadante y el precipitado se volvió a resuspender con buffer de lavado y se centrifugó 3 veces más; luego el precipitado se resuspendió en buffer de muestra Laemmli y se calentó a 95°C durante 10 minutos. Se sembraron 150 µg de proteína en un gel 6%. La identificación de las proteínas fosforiladas se realizó utilizando anticuerpo 1° anti-RI o anti-IRS1 según se detalló en la Tabla 2. La detección se realizó con ECL.

## **2.7. Actividades enzimáticas**

### **2.7.1. Actividad de SOD**

Se homogenizaron trozos de hígado con buffer de homogeneización PBS más el agregado de inhibidores de proteasas descrito en el apartado de Western blot, en una relación tejido/buffer 1 + 3.

A partir de este homogenado se obtuvieron microsomas hepáticos por centrifugación diferencial según la técnica de Slater y Sawyer (1971). La fracción precipitada, correspondiente a los microsomas, se resuspendió en 30 mM buffer fosfato, 8,8 g/l KCl, pH 7,4 y se congeló a -80°C hasta su posterior utilización.

La determinación de la actividad se realizó siguiendo el protocolo de Oberley y Spitz (1984). Para ello, a 1 volumen de suspensión de microsomas, se adicionó una mezcla de etanol/cloroformo 0,25/0,15 (v/v). La mezcla de incubó en hielo durante 15 minutos. Luego se agregó 0,1 volúmenes de agua destilada y se centrifugó 15 minutos a 12000 rpm. Con el sobrenadante obtenido se siguió el protocolo detallado en la Tabla 3.

Las diferentes muestras se incubaron durante 60 minutos a 37°C en cada una de las condiciones descriptas en la tabla y finalmente se midió la absorbancia de las mismas a 560 nm. La actividad enzimática se calculó como la diferencia entre la absorbancia de cada muestra y la absorbancia de los controles xantina-oxidasa. Los datos se calcularon expresaron como k/mg de proteína.

**Tabla 3:** protocolo seguido para la medición de la actividad enzimática de SOD total

<b>Reactivo</b>	<b>Blanco (µl)</b>	<b>Control del blanco (µl)</b>	<b>Muestra (µl)</b>	<b>Control de muestra (µl)</b>
Buffer Tris-EDTA	790	890	780	880
NBT	100	100	100	100
Hipoxantina 10mM	10	10	10	10
Muestra	-	-	20	20
Xantina-oxidasa	100	-	100	-

### **2.7.2. Actividad de catalasa**

Se partió de homogenados preparados como se detalló para SOD. La determinación de la actividad de catalasa, se efectuó siguiendo el protocolo de Claiborne (1985). Para ello se adicionó 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM a 2 ml de homogenado. A 1 volumen de esta mezcla se le adicionó 1% Tritón X-100, en proporción 1:10 y finalmente la muestra se diluyó para su lectura con buffer fosfato (1:100 o 1:500). La absorbancia se leyó durante 2 minutos a 240 nm, registrando así la desaparición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos se calcularon empleando el coeficiente de extinción molar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon$ : 40 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) y se expresaron por U/mg de proteína.

### **2.7.3. Actividad de GQ**

Se homogenizaron trozos de hígado en buffer PBS I en una relación tejido/buffer de 1+3 y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. Se determinó la concentración proteica del sobrenadante (o fracción citosólica), como se describió anteriormente.

Para obtener la fracción nuclear se resuspendió el precipitado obtenido en la primera centrifugación en 1 ml del buffer previamente descrito y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en 150  $\mu$ l de buffer con digitonina (KCl 150 mM, Hepes 3 mM, DTT 2 mM y 40  $\mu$ g/ml digitonina, pH 7,4) y se incubó durante 12 minutos a 20°C. Luego se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos y se tomó el sobrenadante. Dicho sobrenadante corresponde a la fracción nuclear. Se determinó la concentración de proteína en ambas fracciones con la técnica descrita anteriormente.

Para medir la actividad de GQ en ambas fracciones, se empleó buffer de reacción conteniendo Hepes 20 mM, KCl 125 mM, MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, Na-ATP 5 mM, NADP 0,5 mM y Gl-6-PDH 0,5 U/ml, pH 7,4. La mezcla de reacción se preparó con 800  $\mu$ l de buffer de reacción más 40  $\mu$ l de glucosa 1

mM o 100 mM (concentraciones finales) más 10 µl de muestra. La mezcla se incubó a 37°C y se midió la absorbancia a 340 nm durante 10 minutos para obtener la cinética enzimática. La actividad de GQ se obtuvo sustrayendo la actividad de hexoquinasa (medida con 1 mM glucosa) de la actividad total (medida con 100 mM glucosa). Los resultados se expresaron como mU/mg proteína.

#### **2.7.4. Actividad de Gl-6-Pasa**

Se obtuvieron microsomas de hígado, homogeneizando muestras en buffer de homogeneización (sacarosa 0,25 M, Tris-acetato 5 mM, Na-EDTA 0,5 mM, pH 7,4), en relación 1+3. El homogenado se centrifugó a 9000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 50000 rpm por 60 minutos. Se descartó el sobrenadante y se adicionó al precipitado 1 ml de buffer de homogeneización sin Na-EDTA y se centrifugó nuevamente a 50000 rpm durante 60 minutos más. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 ml de buffer sin EDTA. Se determinó su concentración proteica según se detalló anteriormente y se congeló a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

Para la determinación, 10 mg de proteína de la muestra se incubaron con y sin Tritón X-100 0,75% (p/v) a 0°C durante 20 minutos. A una alícuota de 50 µl de cada muestra se le agregaron 400 µl de AcNa 100 mM (pH 6,5) y 50 µl de Gl-6-Pi 0,8 M y se incubó durante 10 minutos a 30°C. Se detuvo la reacción con el agregado de 250 µl de TCA 10%. A 200 µl de cada muestra se agregó 2 ml de MoNH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N y 320 µl de FeSO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,15 N. La absorbancia se determinó a 660 nm. Los resultados se expresaron como latencia % = (1-actividad en microsomas intactos/actividad en microsomas permeabilizados) x100 (Zoccoli y col., 1982).

**2.7.5. Actividad de Gl-6-PDH**

Se realizaron homogenados de hígado en buffer Tris/HCl 0,1 M, EDTA 1 mM (pH 7,6), en relación 1+9. Los mismos se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar a 9000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó para determinar actividad enzimática, midiendo la producción de NADPH a 5 y 10 minutos mediante espectrofotometría a 340 nm. Para ello se siguió el protocolo que se presenta en la Tabla 4, previa medición de la concentración proteica como se describió previamente.

Se calculó la diferencia de las absorbancias obtenidas a los 10 y 5 minutos para cada cubeta y la actividad enzimática se obtuvo sustrayendo el delta de la cubeta 4 del delta de la cubeta 3. Los resultados se expresaron como U/mg proteína (Beutler, 1975).

**Tabla 4:** protocolo seguido para la medición de la actividad enzimática de Gl-6-PDH. Se detallan las concentraciones y los volúmenes empleados de cada reactivo

<b>Solución</b>	<b>Cubeta 1</b>	<b>Cubeta 2</b>	<b>Cubeta 3</b>	<b>Cubeta 4</b>
Tris-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
MgCl <sub>2</sub> 0,1 M	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
NADP 2 mM	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Muestra	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
H <sub>2</sub> O	695 µl	595 µl	595 µl	495 µl
Incubación durante 10 minutos a 37°C				
Gl-6-P 6 mM		100 µl		100 µl
6-PGA 6 mM			100 µl	100 µl

### **2.7.6. Actividad de FO**

Se realizaron homogenados con buffer de homogeneización (Hepes 25 mM, KCl 100 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,1; con el agregado de inhibidores de proteasas del mismo modo en que se detalló para la preparación de muestras para Western blot) en relación 1+3. Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se midió la concentración de proteínas como se describió anteriormente.

Se tomó el volumen correspondiente a 20 µg de proteína y se adicionaron 200 µl de buffer de reacción (Hepes 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, KCl 25 mM, NaF 10 mM, D-fructosa 5 mM, NADH 0,2 mM, fosfoenolpiruvato 1 mM, piruvato quinasa 40 U/ml y LDH 40 U/ml, pH 7,1). Se realizaron las mezclas de reacción por duplicado, incluyendo o no N-acetil-D-glucosamina 1 M en dicho buffer. La mezcla de reacción se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente y luego se adicionaron 10 µl de ATP 5 mM. La actividad se midió en espectrofotómetro a 340 nm durante 10 minutos. Los resultados se expresaron como mU/mg proteína.

## **2.8. Otras mediciones**

### **2.8.1. TBARS en hígado**

La peroxidación lipídica se determinó midiendo el contenido hepático de TBARS por el método del ácido tiobarbitúrico (Pompella y col., 1987). Para ello se realizaron homogenados de trozos de hígado con buffer de homogeneización fosfato-K (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KCl 11,5 g/l, pH 7,4, relación buffer/tejido 1 + 4). A 1 ml de homogenado se adicionó 1 ml de TCA 10% (p/v) y la mezcla se incubó a 0°C durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 2000 rpm, a 4°C durante 10 minutos. Al sobrenadante obtenido se le adicionó un volumen de ácido tiobarbitúrico al 0,7% y se incubó a 100°C durante 15 minutos. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, y se

midió la absorbancia a 535 nm contra un blanco conteniendo la mezcla de reacción pero sin homogenado hepático. El contenido de TBARS se expresó como nmol MDA/g tejido utilizando un coeficiente de extinción molar de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **2.8.2. Estimación del contenido de GSH hepático**

El contenido de GSH hepático se determinó por el método de Ellman (Sedlak y Lindsay, 1968).

Para ello, una alícuota del homogenado obtenido como se describe en la sección precedente se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos. A 410  $\mu\text{l}$  del sobrenadante obtenido se agregaron 90  $\mu\text{l}$  de TCA 28% y se incubó a 4°C durante 1 hora, seguido de centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos.

A 25  $\mu\text{l}$  del sobrenadante resultante se adicionaron 475  $\mu\text{l}$  de TCA 5%, 1 ml de buffer Tris-HCl 0,01 M (pH 8,9) y 25  $\mu\text{l}$  de 10 mM ácido ditionitrobenzoico -DTNB- (0,4% en metanol), y en forma inmediata se midió la absorbancia a 412 nm contra un blanco de TCA y Tris. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}$  de GSH/g tejido.

### **2.8.3. Proteínas carboniladas**

Se tomaron 500  $\mu\text{l}$  del homogenado previamente realizado, se diluyeron 1+4 en agua destilada y a cada muestra se le adicionaron 3 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina DNPH 10 mM, en HCl 2 M y se incubaron una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, la muestra se precipitó con 4 ml de TCA 20% y se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 4 ml de TCA 10% al precipitado. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y al precipitado obtenido se le agregaron 3 ml de etanol/acetato de etilo (1:1 v/v). Se centrifugó nuevamente y se repitió el último paso 3 veces más. Finalmente se agregaron 2 ml de

guanidina 6 M y se incubó a 37°C durante 60 minutos. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos y se midió la absorbancia a 366 nm (Levine y col., 1990). Los blancos se procesaron del mismo modo que las muestras pero sin el agregado de DNPH. Los resultados se expresaron como nmol de carbonilos/mg de proteína, empleando un coeficiente de extinción molar 21000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### **2.8.4. Capacidad antioxidante mediante ensayo ABTS**

Se partió de homogenados como se detalló para TBARS en hígado. Este ensayo se basa en la inhibición de la absorbancia del radical catiónico ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzotiazolína-6-sulfonato), que tiene un espectro de absorción extenso con picos en 660, 734 y 820 nm. El radical ABTS<sup>+</sup> es generado al colocar ABTS 7 mM en solución acuosa con persulfato de potasio 2,45 mM en oscuridad durante 12-16 horas. La capacidad antioxidante del tejido se determinó según la metodología descrita por Katalinic y col. (2005) con algunas modificaciones. La solución de ABTS<sup>+</sup> se diluyó en PBS hasta alcanzar una absorbancia de 0,70 (±0,02) a 734 nm. A un mililitro de esta dilución se adicionaron 10 µl del homogenado del tejido o del estándar Trolox. La mezcla de reacción se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente y luego se determinó la absorbancia a 734 nm. Se realizó una curva de calibración de Trolox (0-200 µg) y los resultados se expresaron como µg de equivalentes Trolox/mg proteína.

#### **2.8.5. Determinación de glucógeno hepático**

Muestras de hígado (0,5 g) se colocaron en 1 ml de KOH 33% y se incubaron a 100°C durante 20 minutos. Se enfriaron a 0°C, se agregaron 1,25 ml de alcohol y se incubaron a 4°C durante 48 horas. Las muestras se centrifugaron a 2400 rpm durante 20 minutos y el precipitado obtenido se resuspendió en 1 ml de agua destilada más 3 ml de reactivo de antrona 100



mg% (en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 84%) y se incubaron a 100°C por 20 minutos. La absorbancia se midió a 620 nm y cada lectura se interpoló en una curva de referencia de concentraciones conocidas de glucógeno. Los resultados se expresaron en µg glucógeno/mg tejido.

#### **2.8.6. Evaluación histológica del contenido de TG hepáticos**

Se emplearon trozos de hígado correspondientes al mismo lóbulo en cada animal. Los mismos se colocaron en formol al 4% en PBS al momento del sacrificio y se guardaron a 4°C hasta su procesamiento.

Los hígados se congelaron y cortaron con micrótopo de congelación con nieve carbónica Leitz. Los cortes de 20-40 µm se tiñeron con Sudán Red Oil (1 gr/100 ml alcohol 70°/acetona) durante 1 minuto. El exceso de colorante se eliminó mediante inmersión en alcohol 70° y posteriormente se lavaron con agua destilada. Finalmente, los cortes se recogieron en porta objetos. Se realizaron observaciones con microscopio óptico convencional.

#### **2.9. Análisis estadístico de datos**

Los datos se expresan como la media ± error estándar para el número indicado de observaciones o fueron ilustrados por una observación representativa obtenida de diferentes experimentos. El análisis estadístico se realizó empleando ANOVA seguida de aplicación del test de Dunnet para comparaciones múltiples utilizando el programa de análisis Prism Graf Pad (San Diego, EE.UU.). Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue <0,05.

## ***RESULTADOS***

---

### **3.1. Seguimiento de los animales en tratamiento y determinación de parámetros séricos**

#### **3.1.1. Ingesta de comida y bebida. Ganancia de peso corporal al final del tratamiento**

Durante los 21 días de tratamiento se controló el peso de los animales y la ingesta de bebida y comida.

Como puede apreciarse, no se hallaron diferencias significativas en la bebida y calorías consumidas entre los diferentes grupos, ni tampoco en la ganancia de peso. Por otra parte, la ingesta de alimento de los animales que consumen fructosa fue significativamente menor que en los C, probablemente debido a que estos animales sacian su apetito parcialmente con la ingesta de este monosacárido en el agua de bebida. A pesar de ello, el consumo de calorías totales no se altera, por lo que podemos afirmar que se trata de dietas isocalóricas (Tabla 5).

**Tabla 5:** ingesta de comida, bebida, calorías consumidas y ganancia de peso corporal

<b>Tratamientos</b>	<b>C</b>	<b>CL</b>	<b>F</b>	<b>FL</b>
<b><i>Ingesta de comida (gr/animal/día)</i></b>	21,92 ± 1,2	21,37 ± 0,7	16,88 ± 1,1*	17,49 ± 0,7*
<b><i>Ingesta de bebida (ml/animal/día)</i></b>	29,83 ± 2,35	26,83 ± 1,64	50,96 ± 9,91	33,20 ± 4,15
<b><i>Ingesta calórica (Kcal/día)</i></b>	63,22 ± 3,41	61,74 ± 1,96	69,14 ± 3,19	63,80 ± 2,02
<b><i>Ganancia de peso (gr)</i></b>	106,2 ± 6,77	88 ± 7,89	97,21 ± 4,43	93,92 ± 5,12

\* p<0,05 vs C; ^ p<0,05 vs F. n=12

### 3.1.2. Determinación de parámetros séricos

Los animales de los diferentes grupos experimentales son normoglucémicos, mientras que los animales tratados con fructosa presentan valores significativamente mayores de insulinemia y trigliceridemia, con una disminución de la sensibilidad a la insulina, de la función de la célula  $\beta$  y menor sensibilidad a la insulina a nivel hepático, como lo demuestran los índices HOMA-IR, HOMA- $\beta$  e ISHI, respectivamente. Por otra parte, en los animales FL se revierten dichas alteraciones (Tabla 6). En cuanto a los marcadores de daño hepático, la AST está incrementada en los animales tratados con AL, tanto en los animales CL como en los FL, mientras que no se encontraron diferencias entre tratamientos en los niveles de ALT.

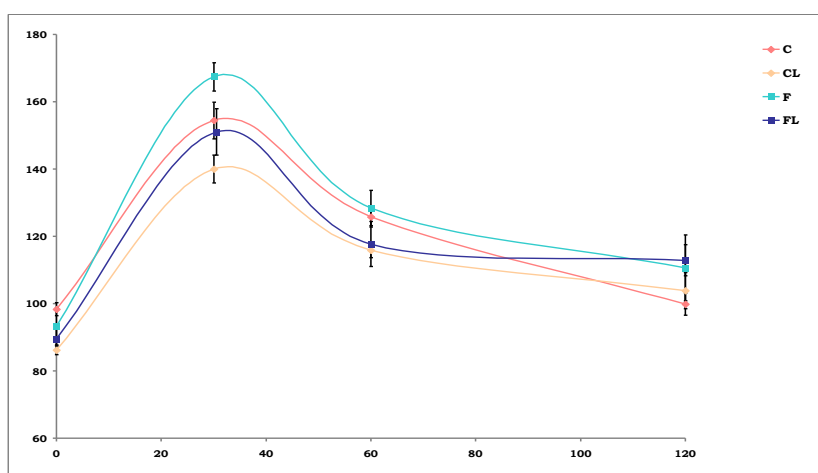
**Tabla 6:** parámetros séricos e índices calculados a partir de los mismos

<b>Tratamientos</b>	<b>C</b>	<b>CL</b>	<b>F</b>	<b>FL</b>
<b>Insulinemia (ng/ml)</b>	0,76 $\pm$ 0,03	0,6 $\pm$ 0,08	1,13 $\pm$ 0,05*	0,74 $\pm$ 0,08 <sup>^</sup>
<b>Glucemia (mg/dl)</b>	114 $\pm$ 5	104 $\pm$ 4	110 $\pm$ 4	115 $\pm$ 3
<b>Trigliceridemia (mg/dl)</b>	83,05 $\pm$ 4,43	70,2 $\pm$ 11,2	153,6 $\pm$ 5,4*	97,5 $\pm$ 9,8 <sup>^</sup>
<b>HOMA-IR</b>	5,1 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 0,6	8,03 $\pm$ 0,12*	5,4 $\pm$ 0,8 <sup>^</sup>
<b>HOMA-<math>\beta</math></b>	58 $\pm$ 4	48 $\pm$ 5	87 $\pm$ 5*	55 $\pm$ 4 <sup>^</sup>
<b>ISHI</b>	5,76 $\pm$ 0,76	5,5 $\pm$ 0,61	2,26 $\pm$ 0,44*	3,65 $\pm$ 0,25
<b>TBARS (picomol/mg prot)</b>	102 $\pm$ 4,4	69,6 $\pm$ 14	111,5 $\pm$ 6,5	46,5 $\pm$ 9,3 <sup>^</sup>
<b>ALT (U/l)</b>	42,12 $\pm$ 2,7	48,15 $\pm$ 2,1	36,89 $\pm$ 1,7	45,7 $\pm$ 3,6
<b>AST (U/l)</b>	107,3 $\pm$ 13,6	147,7 $\pm$ 11*	98,02 $\pm$ 11,4	158,6 $\pm$ 9,5 <sup>^</sup>

\* p<0,05 vs C; <sup>^</sup> p<0,05 vs F. n=12

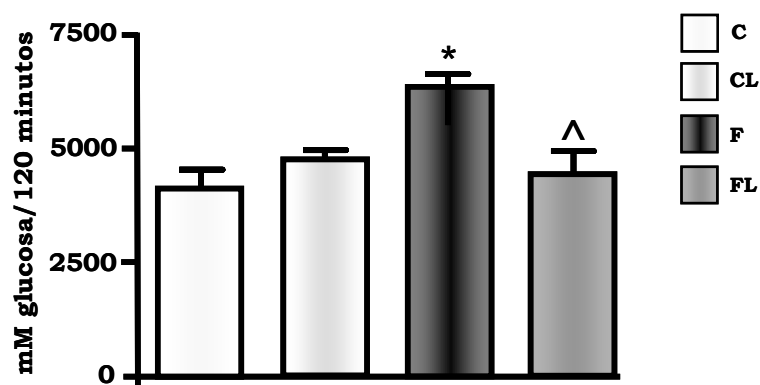
### 3.1.3. Curva de tolerancia oral a la glucosa

Tras 21 días de tratamiento y 8 horas de ayuno, se realizó la curva de tolerancia oral a la glucosa. Luego de la sobrecarga, el pico de glucemia se registró a los 60 minutos, siendo más elevado en los animales tratados con F, mientras que disminuyó por debajo del control en los animales FL. Sin embargo, a los 120 minutos post sobrecarga, los animales F y FL presentaron una glucemia similar a la de los animales C (Figura 12).



**Figura 12:** Curva de tolerancia oral a la glucosa. n=6

Al realizar la cuantificación de las áreas bajo la curva se pudo observar claramente que los animales tratados con fructosa presentan TGA, mientras que el tratamiento con AL es capaz de revertirla (Figura 13).

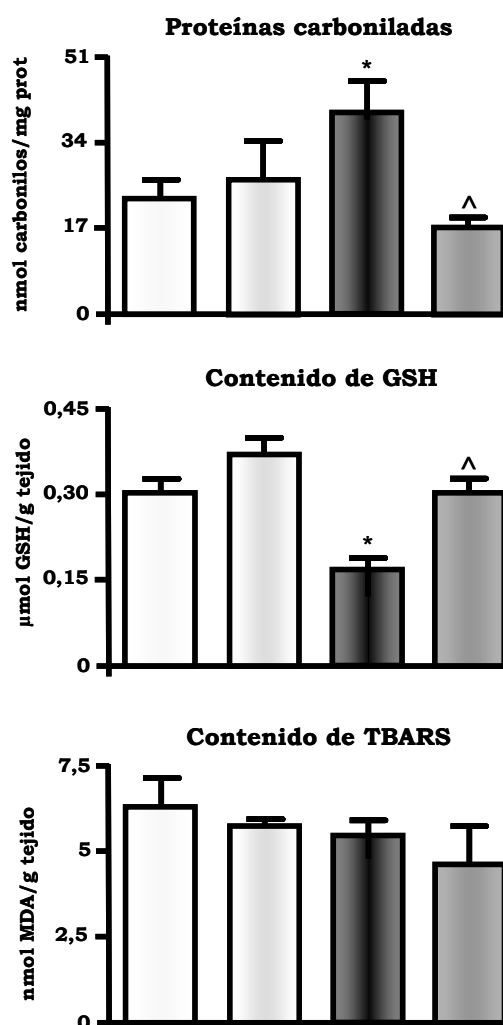


**Figura 13:** Áreas bajo la curva. A la derecha se muestran las referencias de los grupos experimentales. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F. n=6

## 3.2. Marcadores de estrés oxidativo

### 3.2.1. Contenido hepático de GSH, proteínas carboniladas y TBARS

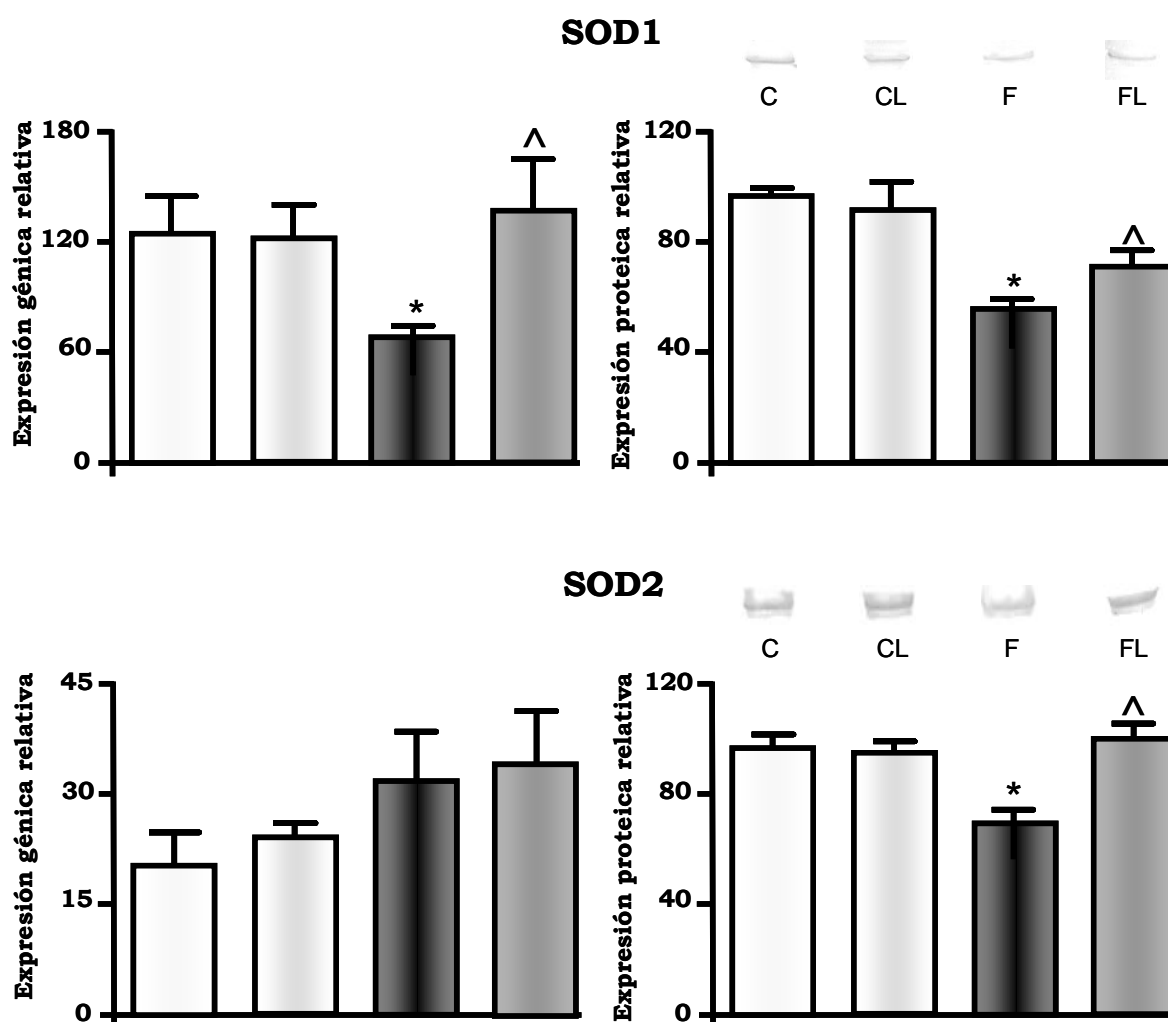
Al estudiar los marcadores de EO, se observó que la DRF promueve el incremento del contenido de proteínas carboniladas y la disminución de GSH en el hígado, lo que demuestra la existencia de un estado de EO en este órgano. El tratamiento con AL revirtió las alteraciones producidas por la dieta en estos parámetros (Figura 14). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en el contenido de TBARS plasmáticos (ver datos en Tabla 6) ni hepáticos entre grupos, excepto en los animales FL, que presentaron menor concentración de TBARS plasmáticos respecto a los F.



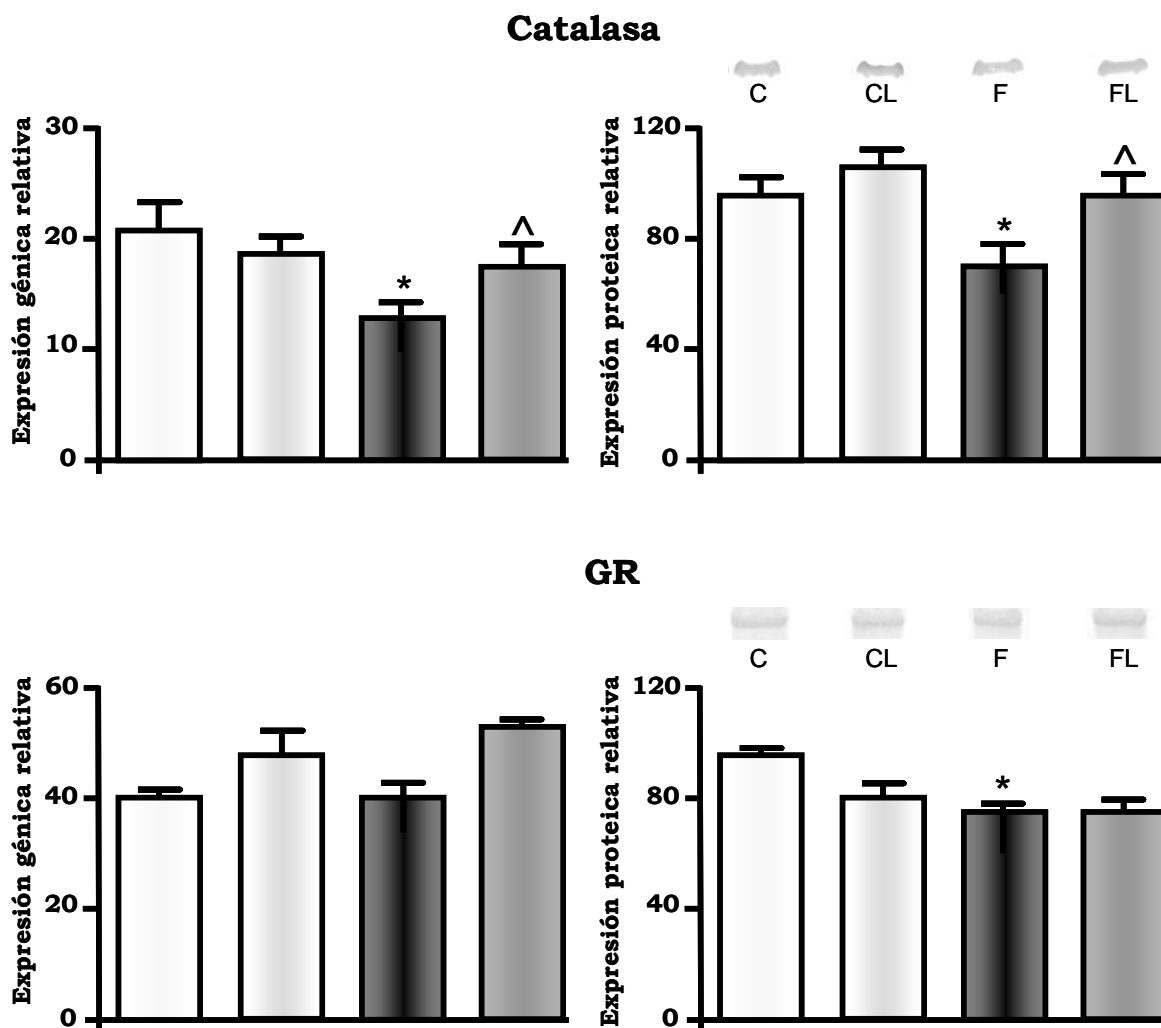
**Figura 14:** Contenido hepático de proteínas carboniladas, GSH y TBARS. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F.  $n = 8$

### 3.2.2. Expresión génica y proteica de SOD1, SOD2, catalasa y GR

Tanto la expresión génica (excepto SOD2 y GR) como los niveles proteicos de las enzimas estudiadas se encuentran disminuidos significativamente en los animales tratados con fructosa respecto de los C. Los mismos se revierten con el tratamiento con AL (Figuras 15 y 16). Estos resultados demuestran que la DRF provoca una alteración del sistema antioxidante celular, lo cual aporta más evidencia de la presencia de un estado de EO, además del incremento de proteínas carboniladas y disminución en el contenido de GSH anteriormente mencionados.



**Figura 15:** Expresión génica y proteica de SOD1 y SOD2. La expresión génica se expresa como expresión relativa respecto a  $\beta$  actina x 1000. La expresión proteica se expresa en forma relativa respecto al C. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F. n= 6



**Figura 16:** expresión génica y proteica de catalasa y GR. La expresión génica se expresa como expresión relativa respecto a  $\beta$  actina  $\times$  1000. La expresión proteica se expresa en forma relativa respecto al C. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F.  $n=6$

### 3.2.3. Actividad enzimática de catalasa y SOD

La actividad de catalasa disminuyó significativamente en los animales tratados con F, mientras que el tratamiento con AL no fue capaz de revertirla completamente. Por su parte, la actividad de SOD total presentó una disminución en los animales F, la cual se incrementó, aunque no significativamente en los animales tratados con AL (Tabla 7).



**Tabla 7:** actividad enzimática de catalasa y SOD total

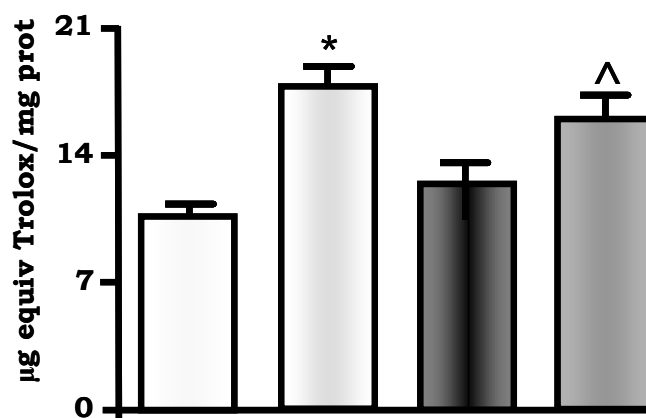
<b>Tratamientos</b>	<b>C</b>	<b>CL</b>	<b>F</b>	<b>FL</b>
<i>Actividad de catalasa</i>	0,65 ± 0,03	0,75 ± 0,07*	0,49 ± 0,02*	0,61 ± 0,07
<i>Actividad de SOD</i>	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,03*	0,9 ± 0,1

La actividad enzimática de catalasa se expresa en U/mg proteína, la actividad de SOD se expresa como k/mg de proteína. \* p<0,05 vs C. n=8

Podemos aseverar que la DRF incrementa los marcadores de EO a nivel hepático y, a su vez, disminuye la expresión génica y proteica de las enzimas del sistema de defensa antioxidante, así como también su actividad, por lo que la capacidad antioxidante total del tejido está disminuida. Contrariamente, el suministro de AL es capaz de restablecer dicha propiedad en gran medida.

#### 3.2.4. Capacidad antioxidante mediante ensayo ABTS

Como puede observarse en la Figura 17, los animales tratados con AL presentan una mayor capacidad antioxidante que los animales C y F, lo que nos aporta más evidencia acerca de la capacidad antioxidante incrementada de los animales FL a nivel hepático.



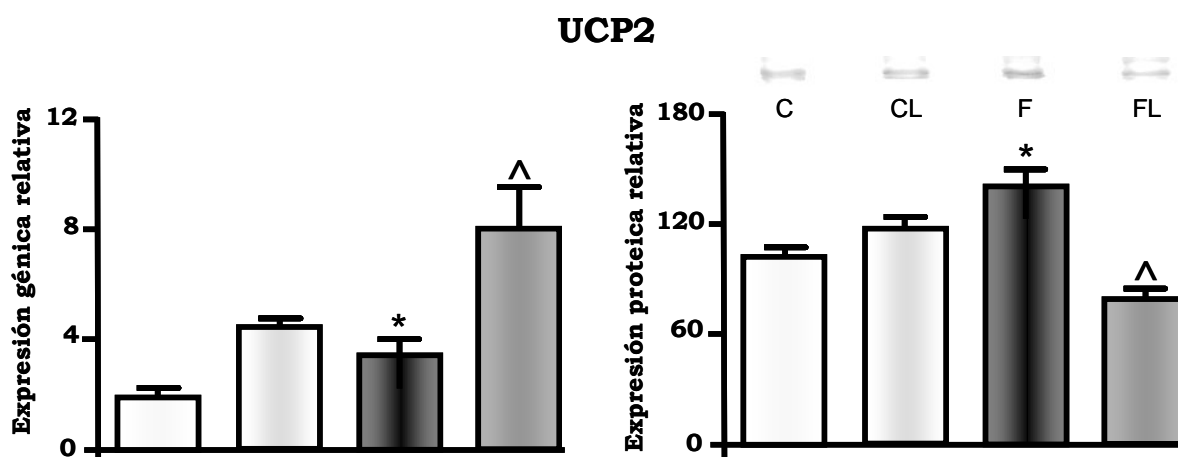
**Figura 17:** capacidad antioxidante expresada como µg de equivalentes Trolox/ mg proteína por 1000. \* p<0,05 vs C; ^ p<0,05 vs F. n=6

### 3.3. UCP2, PPARs y NAD(P)H oxidasa

#### 3.3.1. Expresión génica y proteica de UCP2 y PPARs

Gran parte de los ROS generados en la célula se producen en la cadena transportadora de electrones mitocondrial. La proteína desacoplante mitocondrial 2 (UCP2) desacopla el transporte de electrones (a través de la cadena respiratoria) de la síntesis de ATP y su activación evita la formación de ROS en presencia de una baja disponibilidad de ADP. Por otro lado, los niveles de UCP2 están regulados por factores de transcripción como PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ .

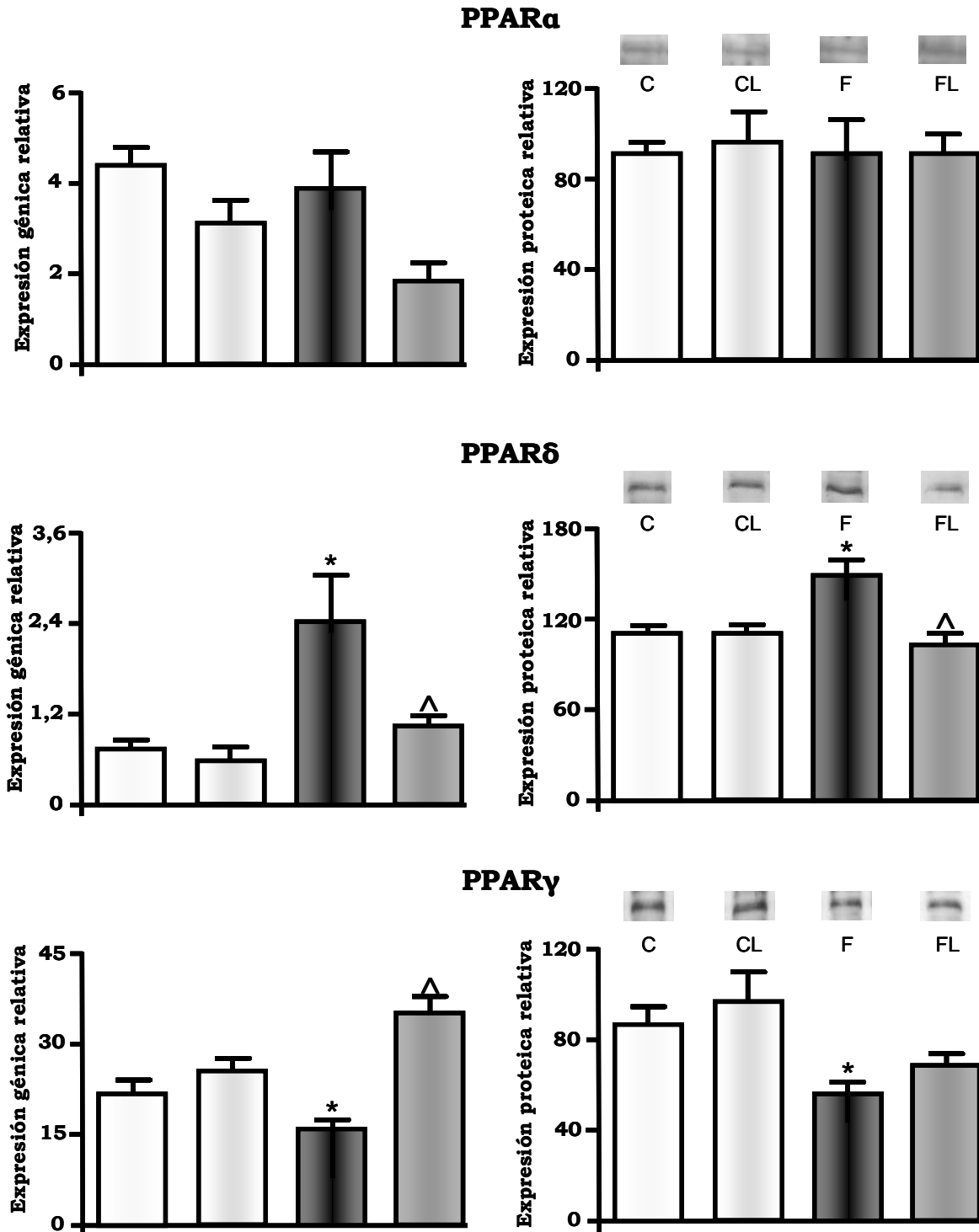
El tratamiento con fructosa induce un incremento significativo en la expresión génica y proteica de UCP2 y de PPAR $\delta$ . Contrariamente, induce una disminución en ambos parámetros en lo que respecta a PPAR $\gamma$ , sin registrarse cambios en la expresión de PPAR $\alpha$ . El tratamiento con AL revierte significativamente dichas alteraciones, excepto en el contenido proteico de PPAR $\gamma$  (Figuras 18 y 19).



**Figura 18:** expresión génica y proteica de UCP2. La expresión génica se expresa como expresión relativa respecto a  $\beta$  actina x 1000. La expresión proteica se expresa en forma relativa respecto al C. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F. n=6

De ello se deduce que a nivel hepático, la expresión génica de UCP2 estaría regulada principalmente por el factor de transcripción PPAR $\delta$  y su

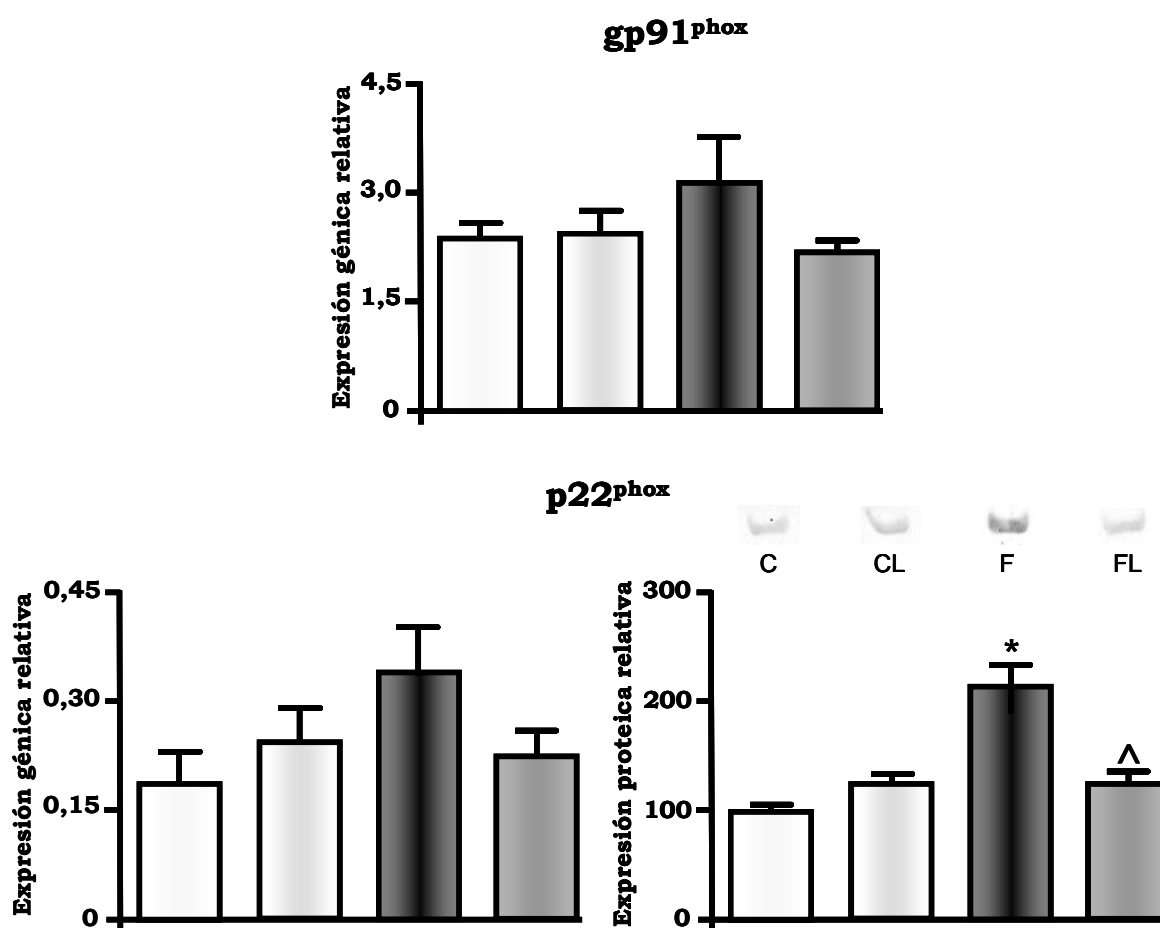
activación sería parte de un mecanismo para evitar la formación de ROS a nivel mitocondrial, cuando se envía mayor cantidad de sustratos a la mitocondria.



**Figura 19:** expresión génica y proteica de PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ . La expresión génica se expresa como expresión relativa respecto a  $\beta$  actina x 1000. La expresión proteica se expresa en forma relativa respecto al C. \*  $p < 0,05$  vs C;  $\Delta$   $p < 0,05$  vs F. n=6

### 3.3.2. Expresión génica y proteica de NAD(P)H oxidasa

Otra fuente generadora de ROS es la enzima NAD(P)H oxidasa, que cataliza la oxidación de NADH o NADPH a  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ , respectivamente, utilizando oxígeno molecular produciendo peróxido de hidrógeno. Se estudiaron dos de las subunidades transmembrana constituyentes de dicha enzima: se midió la expresión génica de  $\text{gp91}^{\text{phox}}$  y la expresión génica y proteica de  $\text{p22}^{\text{phox}}$ . Los resultados se presentan en la siguiente figura (Figura 20).



**Figura 20:** expresión génica de  $\text{gp91}^{\text{phox}}$  y  $\text{p22}^{\text{phox}}$  y expresión proteica de  $\text{p22}^{\text{phox}}$ . La expresión génica se expresa como expresión relativa respecto a  $\beta$  actina x 1000. La expresión proteica se expresa en forma relativa respecto al C. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F. n=6

En los animales F se registra un incremento, aunque no significativo, de la expresión génica de ambas subunidades, el cual se revierte en los animales

FL. Respecto al contenido proteico de p22<sup>phox</sup>, se detectó un aumento significativo en los animales tratados con F, que se corresponde con el incremento en los niveles de ARNm de la misma. La disminución de los niveles proteicos de p22<sup>phox</sup> inducida por el tratamiento con AL también fue estadísticamente significativa respecto a los animales F.

Estos resultados sugieren que una DRF induce un aumento de la formación de ROS, debido a un aumento significativo de la NAD(P)H oxidasa, mientras que el tratamiento con AL sería capaz de revertir esta situación.

### **3.4. Marcadores de inflamación**

#### **3.4.1. Expresión génica de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , NF $\kappa$ $\beta$ y PAI-1**

Se midieron las expresiones génicas de marcadores de inflamación tales como las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ , del factor de transcripción NF $\kappa$  $\beta$  y de PAI-1. En la siguiente tabla se muestran los valores de expresión génica.

*Tabla 8:* expresión génica de marcadores de inflamación

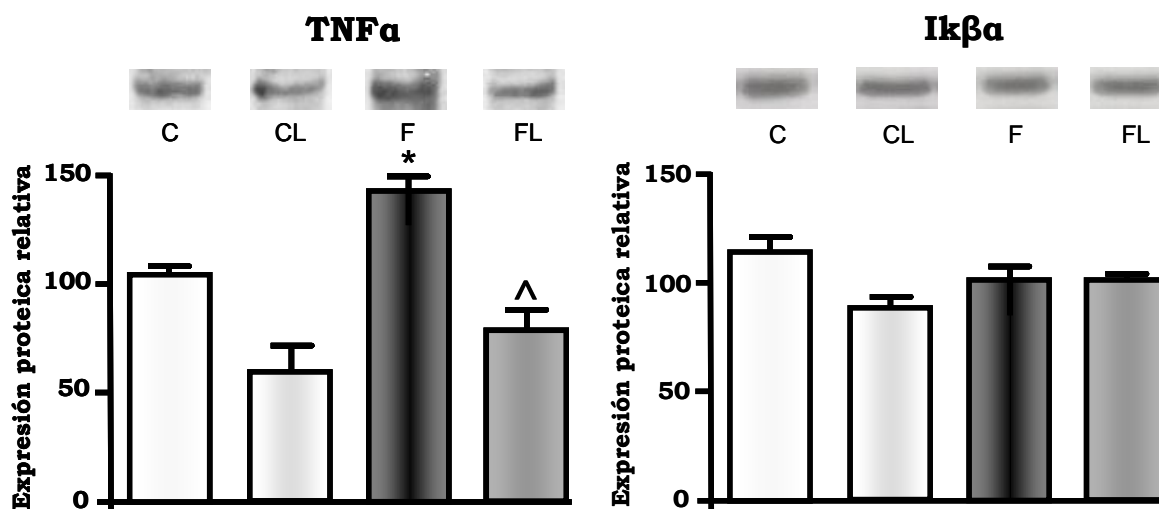
<b><i>Expresión génica relativa</i></b>	<b><i>C</i></b>	<b><i>CL</i></b>	<b><i>F</i></b>	<b><i>FL</i></b>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	0,19 $\pm$ 0,05	0,25 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,06*	0,26 $\pm$ 0,01 <sup>^</sup>
<b>IL1<math>\beta</math></b>	0,61 $\pm$ 0,038	0,73 $\pm$ 0,16	1,5 $\pm$ 0,24*	0,55 $\pm$ 0,13 <sup>^</sup>
<b>PAI-1</b>	0,08 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,02*	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>^</sup>
<b>NF<math>\kappa</math><math>\beta</math></b>	0,77 $\pm$ 0,08	0,69 $\pm$ 0,17	0,95 $\pm$ 0,15	0,70 $\pm$ 0,07

Los datos se expresan como expresión relativa respecto a  $\beta$  actina x 1000. \* p<0,05 vs C; <sup>^</sup> p<0,05 vs F. n=8

En los animales F hay un incremento significativo en los niveles de ARNm de las citoquinas proinflamatorias y de PAI-1. Estos valores retornan significativamente a los niveles controles cuando los animales son tratados con fructosa y AL. Por otro lado, la expresión génica de  $\text{NF}\kappa\beta$  no se ve alterada por ninguno de los tratamientos.

### 3.4.2. Expresión proteica de $\text{TNF}\alpha$ , $\text{I}\kappa\beta\alpha$ y $\text{COX2}$

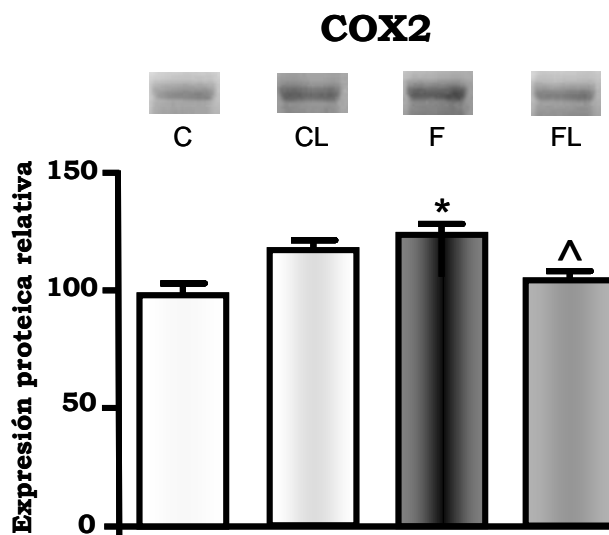
En la Figura 21 se muestra la expresión proteica de  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{I}\kappa\beta\alpha$ . Respecto a la expresión proteica de  $\text{TNF}\alpha$ , se observó que acorde a los resultados de niveles de ARNm, el tratamiento con fructosa produce un incremento significativo en su expresión, mientras que el tratamiento con AL es capaz de reducir dicho aumento. Por otra parte, no se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos respecto a la expresión proteica de  $\text{I}\kappa\beta\alpha$ , lo cual estaría relacionado a los niveles similares de ARNm de  $\text{NF}\kappa\beta$ .



**Figura 21:** expresión proteica de  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{I}\kappa\beta\alpha$ . Los datos se expresan como expresión relativa respecto al C. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$ .  $n = 6$

Por otra parte, la expresión proteica de  $\text{COX2}$  se ve incrementada significativamente en los animales tratados con la DRF. Esto es coherente con el incremento en la expresión génica de los marcadores de inflamación, dado

que varios de ellos son capaces de inducir la expresión de COX2. Dicho aumento se revierte significativamente con el tratamiento con AL (Figura 22).



**Figura 22:** expresión proteica de COX2. Los datos se expresan como expresión relativa respecto al C. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$ . n= 6

Comprobamos de este modo, que la DRF induce un estado de inflamación a nivel hepático, el cual es revertido por el tratamiento simultáneo con AL.

### 3.5. Metabolismo de carbohidratos

Se midió la expresión génica y actividad enzimática de Gl-6-Pasa, la cual cataliza uno de los pasos fundamentales de gluconeogénesis, Gl-6-PDH, como indicador del ciclo de las pentosas y GQ, reguladora de la glucólisis. Además se midió la expresión proteica de esta última, así como también la expresión génica y proteica de PFK-2, enzima reguladora de la actividad de GQ.

Adicionalmente, se determinó la expresión génica de piruvato quinasa (PK) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), la primera participante de

la glucólisis y la segunda de la gluconeogénesis, y se determinó el contenido hepático de glucógeno.

Asimismo, se midieron expresión génica, proteica y actividad enzimática de FQ, enzima encargada de la fosforilación de la fructosa en el hepatocito.

### **3.5.1. Expresión génica de Gl-6-Pasa, Gl-6-PDH, GQ y PFK-2**

Se registra un aumento de la expresión génica de las enzimas estudiadas en los animales F respecto a los C, que fue significativa para Gl-6-PDH y PFK-2. Como contraparte, en los animales FL, existe una tendencia a disminuir los valores hacia los controles (Tabla 9).

**Tabla 9:** expresión génica de enzimas pertenecientes al metabolismo de carbohidratos

<b>Expresión génica relativa</b>	<b>C</b>	<b>CL</b>	<b>F</b>	<b>FL</b>
<b>Gl-6-Pasa</b>	3,8 ± 1,7	5,1 ± 1,1	6,9 ± 1,6	5,1 ± 1,4
<b>Gl-6-PDH</b>	0,57 ± 0,06	0,68 ± 0,21	1,12 ± 0,12*	0,77 ± 0,25
<b>GQ</b>	1,36 ± 0,26	1,32 ± 0,29	2,4 ± 0,69	1,58 ± 0,47
<b>PFK-2</b>	70,2 ± 17,1	99,2 ± 18,2	144 ± 25,2*	132 ± 29,1

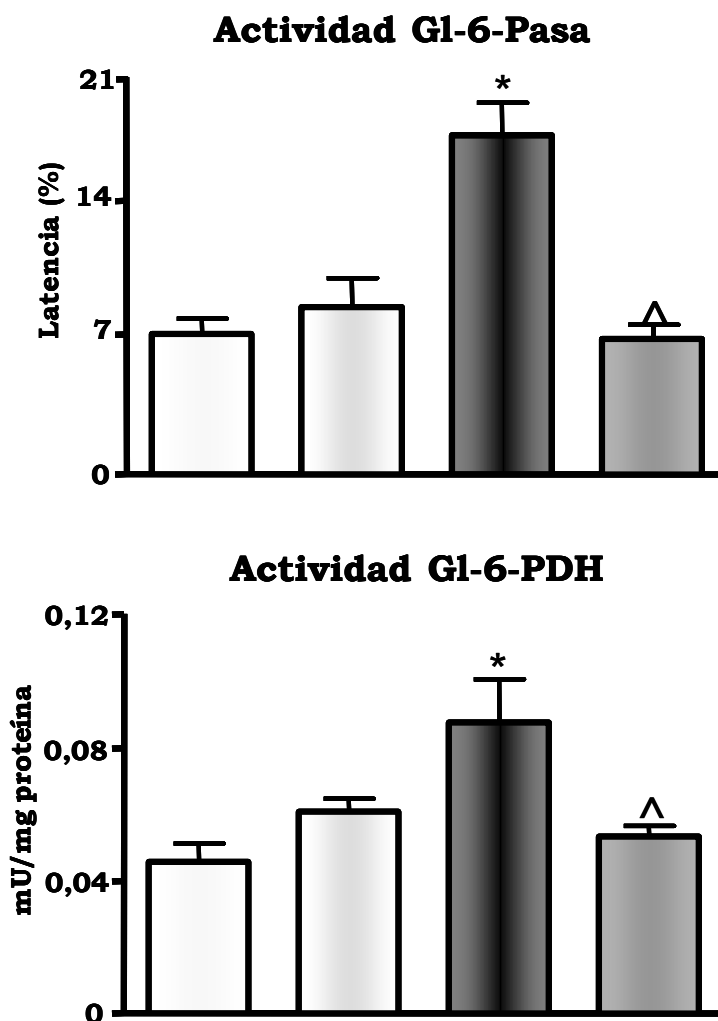
Los datos se expresan como expresión relativa respecto a  $\beta$  actina x 1000. \*  $p < 0,05$  vs C. n=8

### **3.5.2. Actividad enzimática de Gl-6-Pasa y Gl-6-PDH**

Se registra un aumento significativo en la actividad de ambas enzimas en los animales tratados con fructosa respecto a los C, lo cual se correlaciona con los incrementos de expresión génica registrados. Esto corrobora el hecho que al suministrar fructosa a los animales, se incrementan las vías metabólicas de los carbohidratos, como el ciclo fútil de la glucosa y la vía de las pentosas.



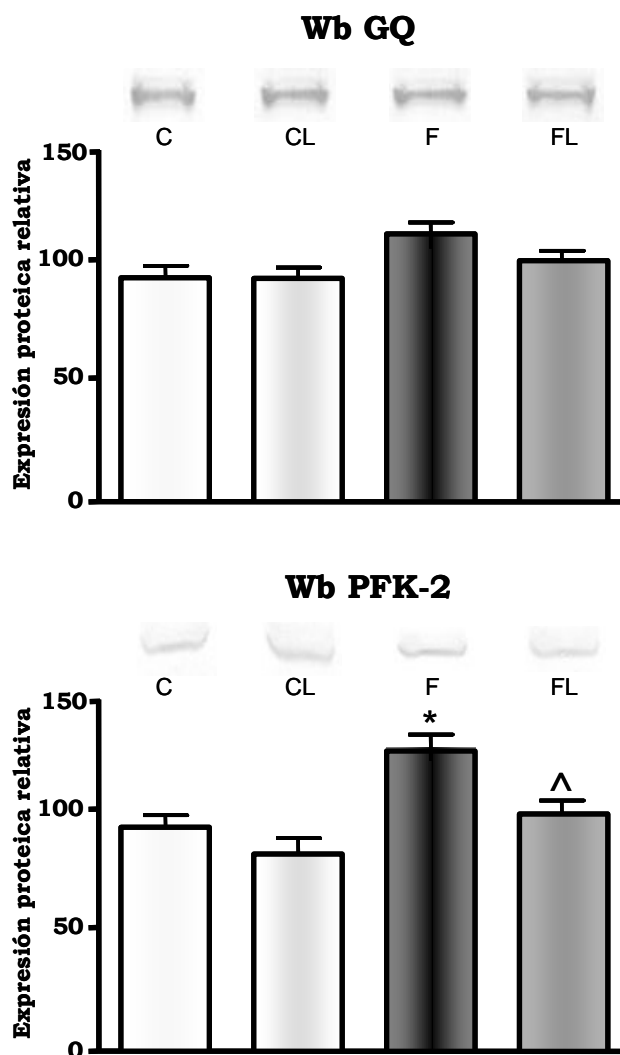
En los animales FL, la actividad de ambas enzimas se encuentra disminuida significativamente respecto de los animales F (Figura 23).



**Figura 23:** actividad enzimática de Gl-6-Pasa y Gl-6-PDH. La actividad de Gl-6-Pasa se expresa como latencia (%). La actividad de Gl-6-PDH se expresa como mU/mg de proteína. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F. n=8

### 3.5.3. Expresión proteica de GQ y PFK-2

El contenido proteico de GQ está levemente incrementado en los animales F respecto a los C, y se mantiene sin variaciones en el resto de los grupos estudiados. Por otro lado, la expresión proteica de PFK-2 está incrementada significativamente en los animales F respecto a C, y disminuye significativamente en los FL (Figura 24).



**Figura 24:** expresión proteica de GQ y PFK-2. Los datos se expresan como expresión relativa respecto al C. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$ . n= 6

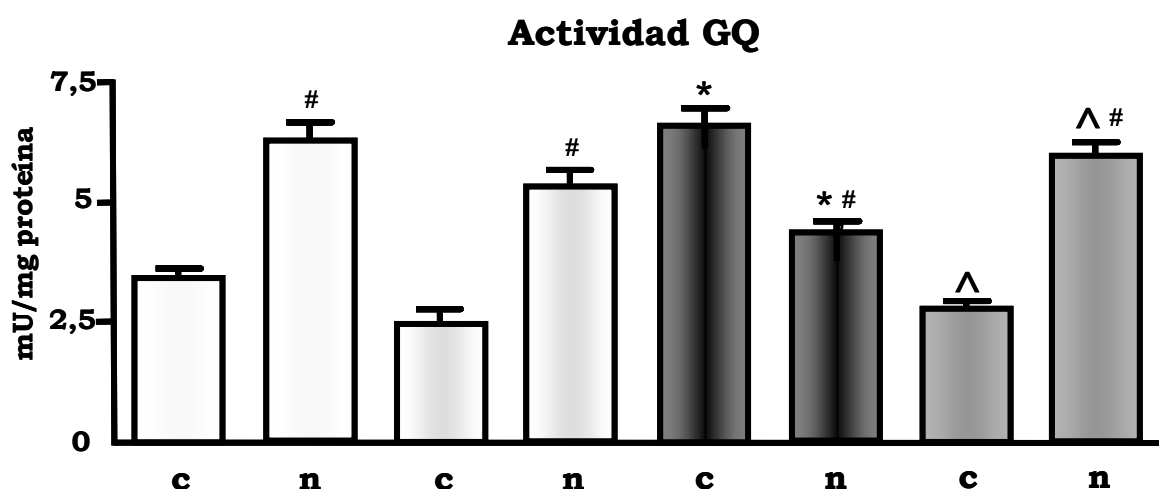
#### **3.5.4. Actividad enzimática de GO en las fracciones citosólica y nuclear**

Al comparar la actividad enzimática entre la fracción citosólica (c) y la nuclear (n) dentro de cada grupo, podemos observar que en los animales C, CL y FL, la misma se ve incrementada significativamente en la fracción nuclear; mientras que en los animales F la actividad es significativamente mayor en la fracción citosólica.

Por otro lado, comparando los animales C y F, se observa que la actividad de la enzima en citosol es significativamente mayor en los F (hecho que corrobora el aumento del ciclo fútil de la glucosa) y significativamente

menor en núcleo. En el tratamiento con AL se registran valores similares a los animales C y significativamente diferentes a los F (Figura 25).

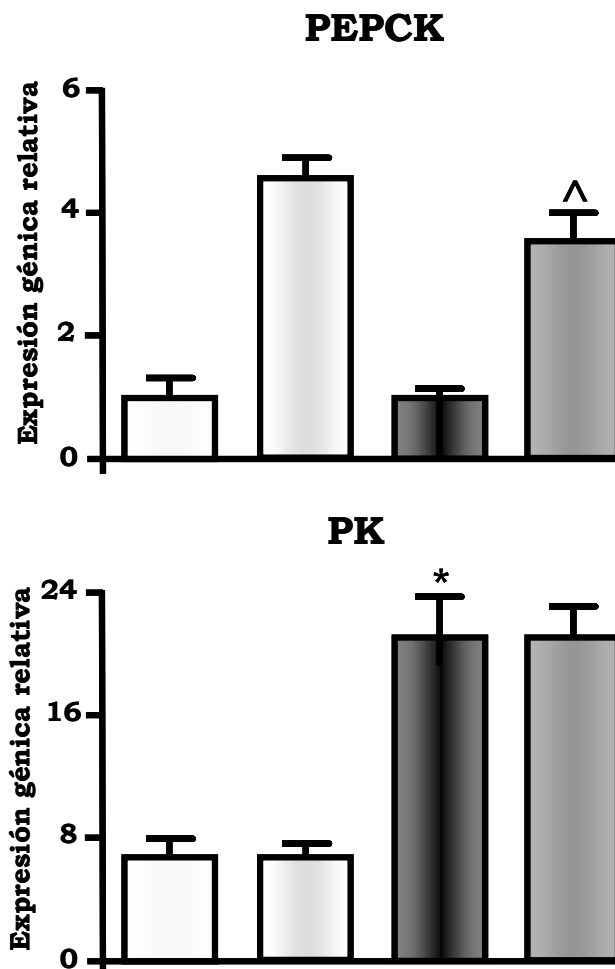
El aumento de actividad de GQ registrada en los animales F sería una respuesta adaptativa a la sobrecarga de fructosa para mantener la homeostasis glucosa/TG en el animal intacto. Paralelamente, el aumento registrado en el contenido proteico de PFK-2 en los animales F, sugiere que esta enzima es la principal reguladora de la actividad de GQ en el órgano.



**Figura 25:** actividad enzimática de GQ. Fracción citosólica (c) y fracción nuclear (n). Se comparan fracciones citosólicas y nucleares entre tratamientos (\*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F) y dentro de cada tratamiento (#  $p < 0,05$  vs c).  $n = 8$

### 3.5.5. Expresión génica de PEPCK y PK

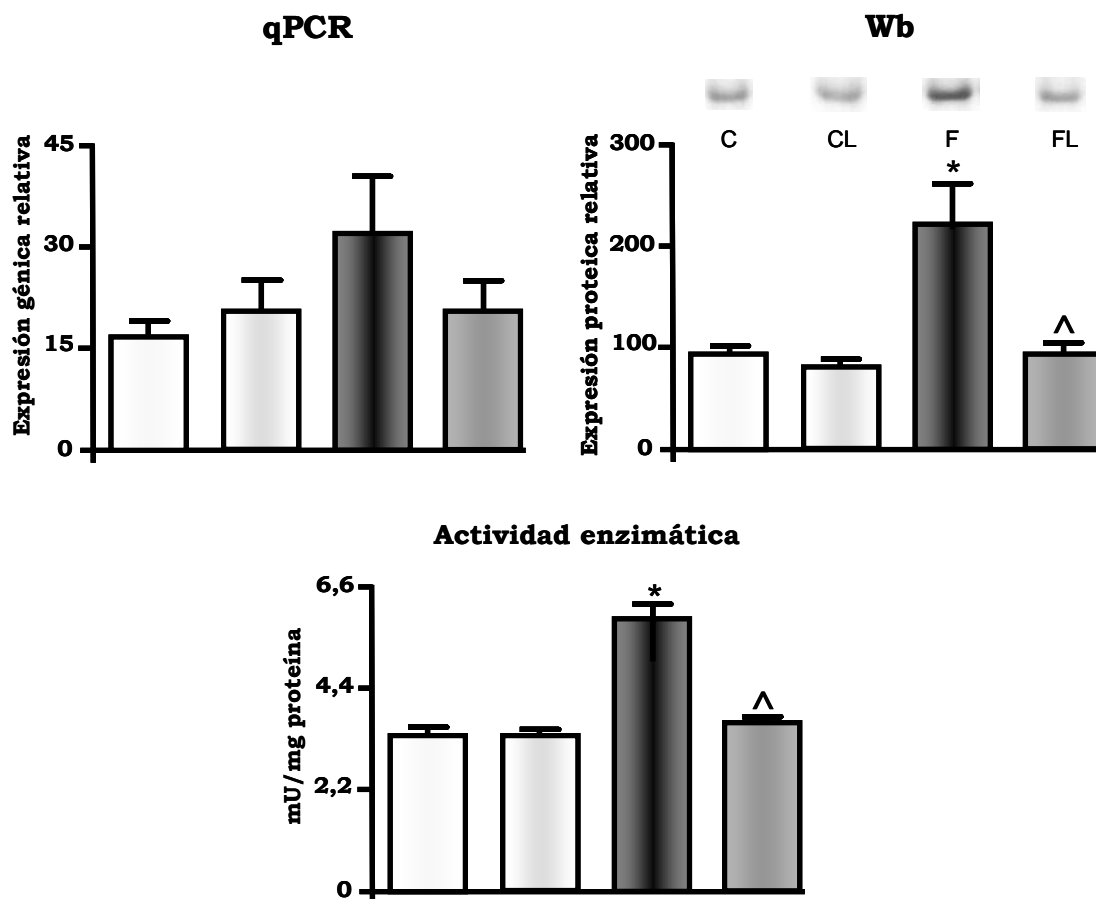
En la Figura 26 se muestran los datos correspondientes a las variaciones de expresión génica de PEPCK y PK. Los niveles de expresión génica de PEPCK en los animales F son similares a los controles, mientras que el AL induce un incremento significativo en los niveles de ARNm. Por otro lado, los niveles de ARNm de PK están aumentados significativamente en los animales F, y el tratamiento simultáneo con AL no es capaz de revertir dicho incremento.



**Figura 26:** expresión génica de PEPCK y PK. La expresión génica se expresa como expresión relativa respecto a  $\beta$  actina x 1 (PEPCK) y x 1000 (PK). \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F. n=8

### **3.5.6. Expresión génica, proteica y actividad enzimática de FQ**

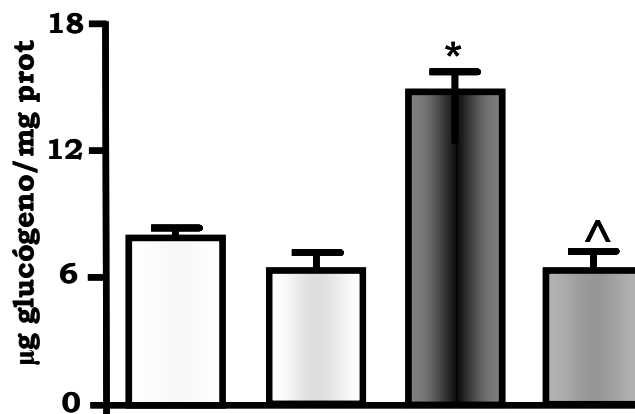
Se registra un aumento significativo de los niveles proteicos y de la actividad enzimática de FQ en el grupo tratado con fructosa. En correlación, se detecta un incremento en los niveles de ARNm. Asimismo, en los animales FL todos estos incrementos se revierten (Figura 27).



**Figura 27:** expresión génica, proteica y actividad enzimática de FQ. La expresión génica se expresa como expresión relativa respecto a  $\beta$  actina x 1000. La expresión proteica se expresa como expresión relativa respecto al C. La actividad enzimática se expresa como mU/ mg proteína. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F. n=6

### 3.5.7. Contenido hepático de glucógeno

En la Figura 28 se muestran los datos del contenido hepático de glucógeno. Se registró un aumento significativo en los niveles de glucógeno en los animales F respecto del grupo C, que disminuyó significativamente en el grupo FL.



**Figura 28:** Los datos se expresan como  $\mu\text{g}$  glucógeno/mg tejido. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F. n=8

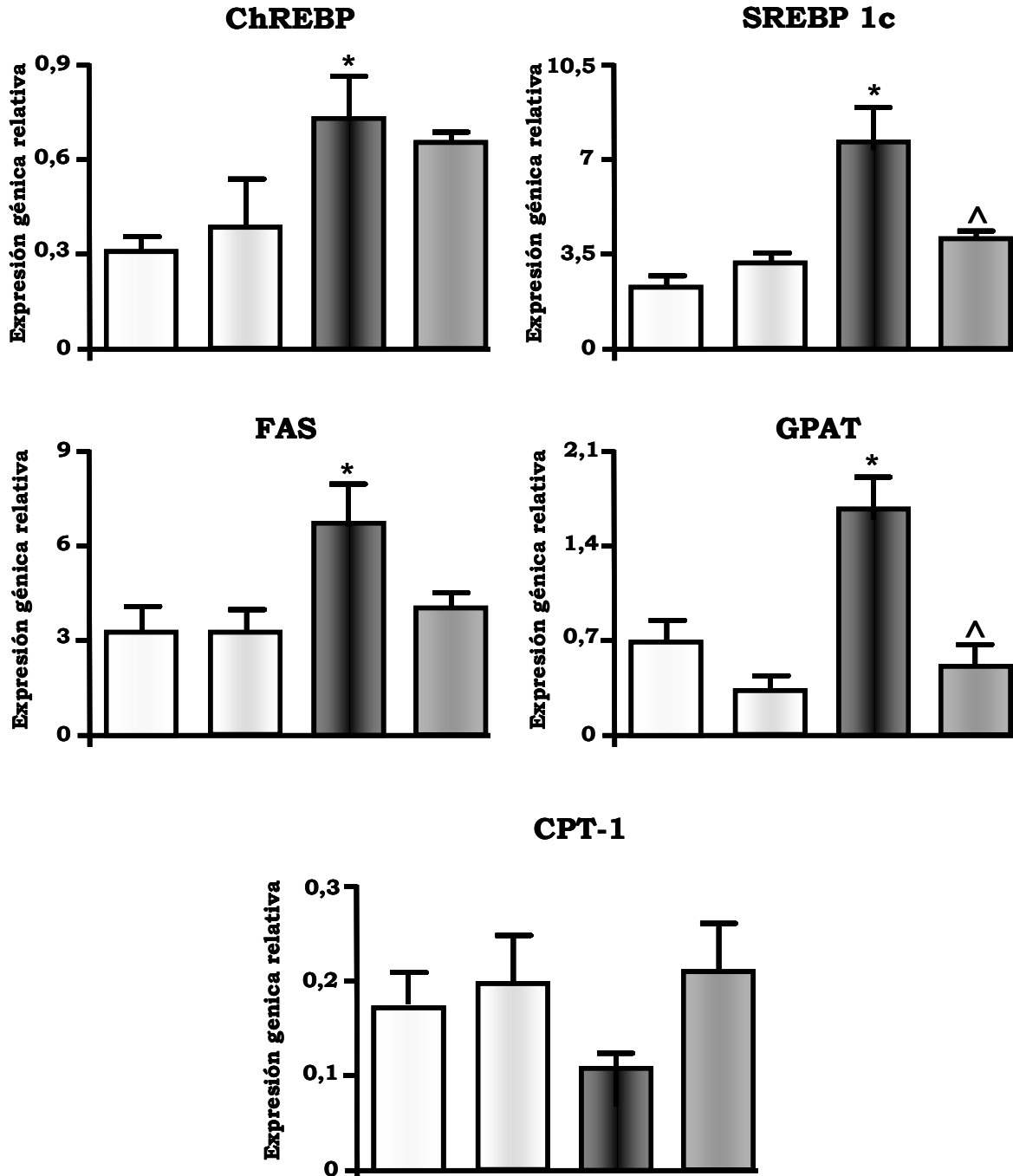
### **3.6. Metabolismo de lípidos**

Se determinó la expresión génica de las enzimas reguladoras de la síntesis de ácidos grasos (FAS) y triglicéridos (glicerol-fosfato-acil-transferasa: GPAT) y de CPT-1, quien regula la síntesis/oxidación de ácidos grasos. También se estudió por histología el depósito de grasa a nivel hepático. Además se midió la expresión génica de los factores de transcripción proteína de unión a elementos reguladores de carbohidratos (ChREBP) y SREBP 1c, responsables de la regulación génica de enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos y el último también involucrado en la regulación del metabolismo de carbohidratos.

#### **3.6.1. Expresión génica de ChREBP, SREBP 1c, CPT-1, FAS y GPAT**

Se registró un incremento significativo en los niveles de ARNm de ChREBP, SREBP 1c, FAS y GPAT en el grupo F respecto al grupo C; mientras que se observó una disminución significativa sólo en los niveles de GPAT en los animales FL. Asimismo, se registró un descenso en los niveles de ARNm de CPT-1 en animales F, con aumento luego del tratamiento con FL, aunque las variaciones no fueron significativas (Figura 29), confirmando

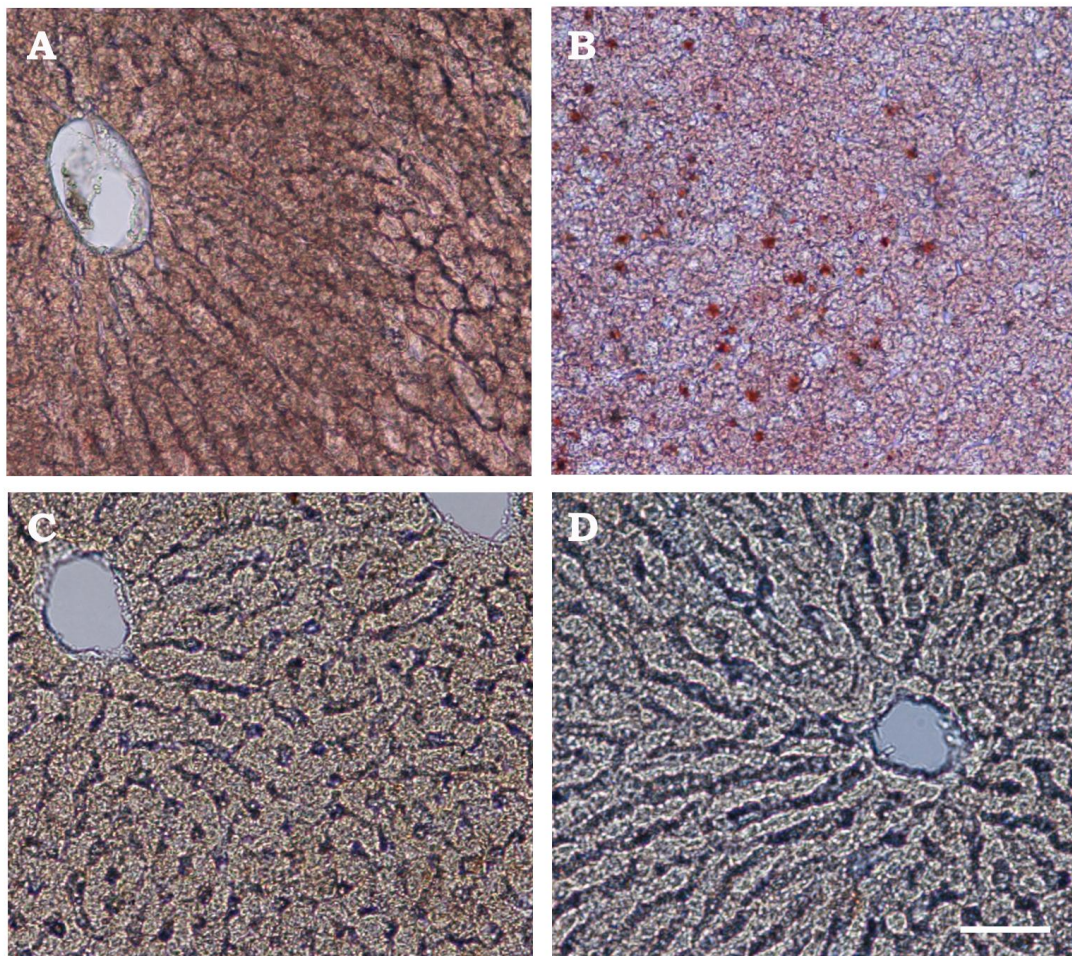
así que hay un incremento en las síntesis de lípidos respecto a su oxidación en los animales F, con reversión de dicho efecto luego del tratamiento con AL.



**Figura 29:** expresión génica de ChREBP, SREBP 1c, CPT-1, FAS y GPAT. La expresión génica se expresa como expresión relativa respecto a  $\beta$  actina x 1000. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F. n= 8

### **3.6.2. Contenido hepático de TG mediante histología**

Se observó depósito de grasa en los animales tratados con fructosa, mientras que el mismo se revirtió en los animales tratados con fructosa y AL. En la Figura 30 pueden observarse las microfotografías obtenidas luego de la tinción con Sudán Red Oil.



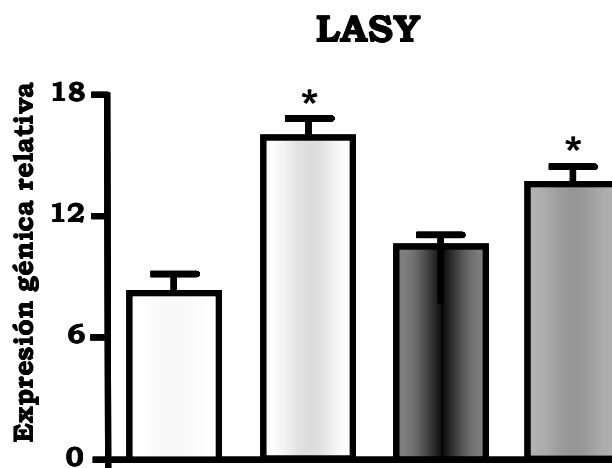
**Figura 30:** fotografías de microscopía óptica convencional de cortes de hígado. La barra equivale a 100  $\mu\text{m}$ . A: C, B: F, C: CL, D: FL.

### **3.7. Expresión génica de LASY**

Se midió la expresión génica de la sintasa de AL, responsable de la síntesis endógena de AL.



No se registran diferencias significativas en los niveles de ARNm entre los animales F y los C, mientras que en los CL y FL se registró un incremento significativo de la expresión génica. Esto demuestra que la administración exógena de AL estimula su síntesis endógena (Figura 31).



**Figura 31:** expresión génica de LAS Y. La expresión génica se expresa como expresión relativa respecto a  $\beta$  actina x 1000. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F. n=8

### 3.8. Señalización de insulina

#### 3.8.1. Expresión génica de IRS1 e IRS2

Se midieron las expresiones génicas de IRS1 e IRS2. En la siguiente tabla se presentan los resultados; en la misma puede apreciarse que no se hallaron diferencias significativas entre tratamientos.

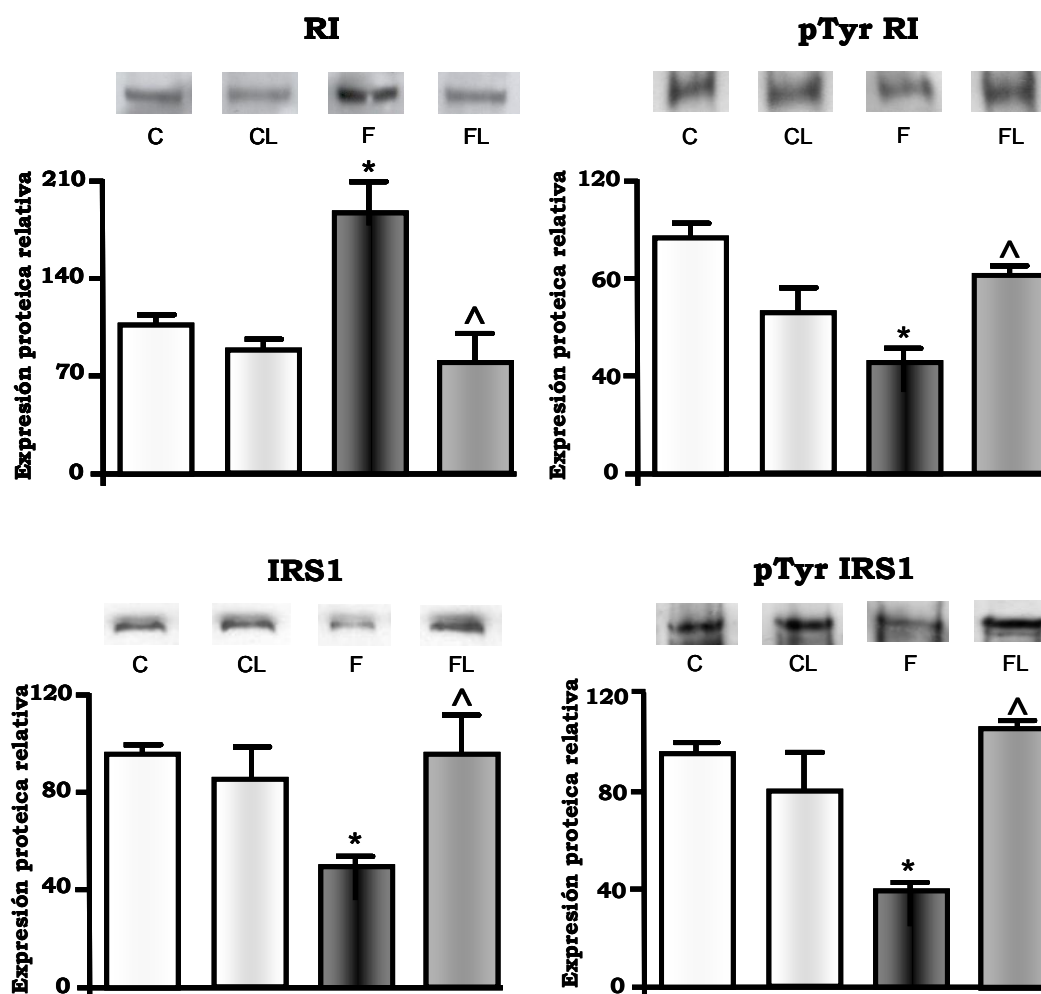
**Tabla 10:** expresión génica de IRS1 e IRS2

<b>Expresión génica relativa</b>	<b>C</b>	<b>CL</b>	<b>F</b>	<b>FL</b>
<b>IRS1</b>	0,35 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,04	0,36 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,05
<b>IRS2</b>	3,4 $\pm$ 0,7	3,8 $\pm$ 1,3	4,4 $\pm$ 1,1	4,3 $\pm$ 1,3

Los datos se expresan como expresión relativa respecto a  $\beta$  actina x 1000. n=8

### 3.8.2. Expresión proteica de RI, IRS1 y su estado de fosforilación en tirosina

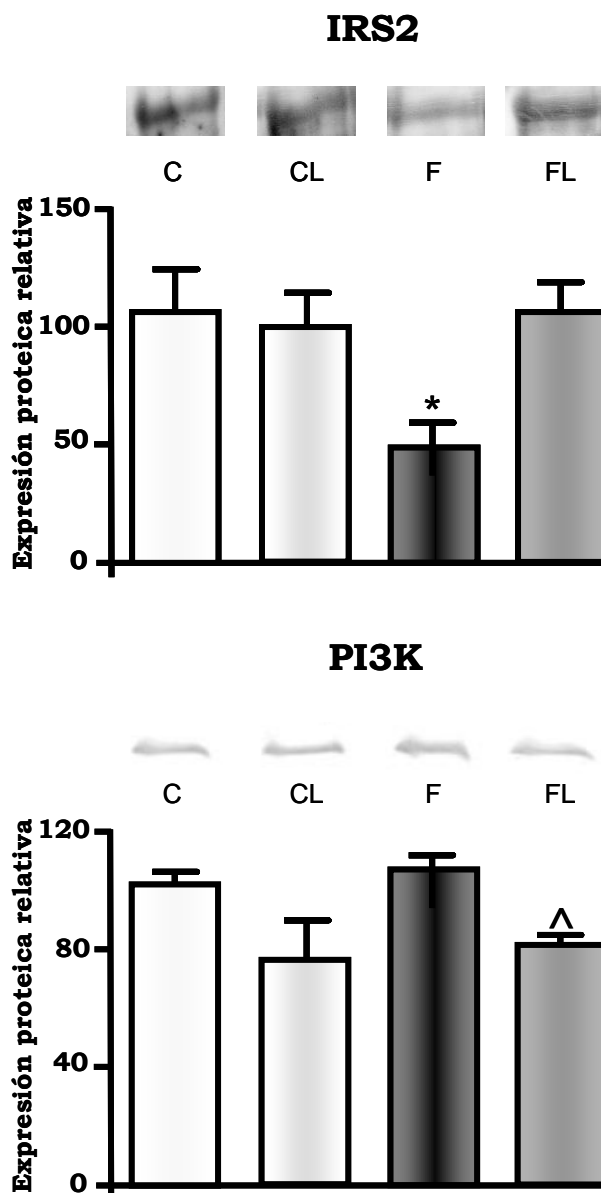
En la Figura 32 se pueden observar las variaciones de expresión proteica del RI y de IRS1 y del nivel de fosforilación estimuladora en tirosina según los distintos tratamientos; en los animales tratados con fructosas se registró un incremento significativo en los niveles proteicos del RI respecto a los animales C, mientras que en los animales tratados con fructosa y AL, este aumento se revierte de modo significativo. Sin embargo, al observar los datos de fosforilación en tirosina, ésta se encuentra disminuida en los animales F, mientras que en los animales FL se revierte este descenso. Asimismo, tanto la expresión proteica de IRS1 como su fosforilación están disminuidas en los animales F, siendo revertido este descenso por el tratamiento con AL.



**Figura 32:** expresión proteica de RI e IRS1 y la fosforilación de cada uno en tirosina. La expresión proteica se expresa como expresión relativa respecto al C. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F. n=8

### 3.8.3. Expresión proteica de IRS2 y PI3K

También se estudió el contenido proteico de IRS2 y de PI3K. Los resultados pueden observarse en la Figura 33.



**Figura 33:** expresión proteica de IRS2 y PI3K. La expresión proteica se expresa como expresión relativa respecto al C. \*  $p < 0,05$  vs C; ^  $p < 0,05$  vs F. n=8

Como puede observarse en la figura anterior, el tratamiento con fructosa provoca una disminución en el contenido proteico de IRS2, sin registrarse modificaciones en los niveles proteicos de PI3K. Por su parte, el

tratamiento con fructosa y AL revierte la disminución en la expresión proteica de IRS2 y produce un descenso en los niveles de PI3K. Claramente, la fructosa altera la cascada de señales de insulina a diferentes niveles de la misma, mientras que el tratamiento con AL es capaz de revertir dichas alteraciones.

## ***DISCUSIÓN***

---

#### **4.1. Consideraciones generales y parámetros séricos**

Tal como hemos demostrado previamente, la administración de una DRF a ratas Wistar macho adultas normales durante tres semanas, induce cambios significativos de indicadores metabólicos y endocrinos en plasma, tales como en hipertrigliceridemia, aumento de ACGL circulantes, hiperinsulinemia con normoglucemia e incremento del índice HOMA-IR. Estas alteraciones se acompañaron, tal como lo describiéramos previamente, de cambios significativos en el metabolismo hepático de lípidos y glúcidos así como de la presencia de marcadores de EO e inflamación (Alzamendi y col., 2009; Castro y col., 2011; Francini y col., 2009; 2010; Rebolledo y col., 2008). Estos cambios sugieren que la administración de la DRF genera un estado de EO acompañado de una disfunción endócrino-metabólica. Esta última está caracterizada por hipertrigliceridemia (disfunción hepática), aumento de los niveles de ácidos grasos (disfunción del tejido adiposo), hiperinsulinemia (hiperfunción de las células  $\beta$ ), que es insuficiente para cubrir la demanda exagerada de insulina condicionada por la IR generalizada (aumento del índice HOMA- $\beta$ ) y en particular del hígado (aumento del ISHI), demostrada por la presencia de TGA.

Es importante destacar que, aunque los diferentes grupos experimentales recibieron dietas isocalóricas, los animales F y FL registraron un mayor consumo de agua (fructosa 10%) y un menor consumo de alimento sólido, lo que condiciona en ellos un mayor consumo de carbohidratos y fructosa en particular. Estos cambios en la ingesta no generaron diferencias significativas en la ganancia de peso entre los cuatro grupos experimentales empleados.

Cuando los animales alimentados con DRF recibieron simultáneamente  $\alpha$ -AL, se previnieron los cambios registrados en los niveles séricos de insulina, TG, HOMA-IR, HOMA- $\beta$ , TGA e ISHI.

Estos datos concuerdan con los publicados por Jacob y col. (1996), quienes demostraron que la administración de  $\alpha$ -AL a ratas obesas Zucker durante 10 días (100 mg/kg), disminuyó los niveles séricos de insulina y TG. Otros autores han descrito resultados similares: una disminución de dichos

parámetros en forma dosis dependiente al suministrar dietas con 1 a 5 g/kg de  $\alpha$ -AL a ratas normales (Huong e Ide, 2008); Thirunavukkarasu y col. (2004) observaron que la administración simultánea de fructosa (61%) y  $\alpha$ -AL (35 o 70 mg/kg) a ratas normales durante 20 días, disminuyó el efecto inducido por la dieta sobre la glucemia y la insulinemia, mejorando la trigliceridemia, el HOMA-IR y la TGA, demostrando así que el  $\alpha$ -AL mejoró la sensibilidad a la insulina.

#### **4.2. Marcadores de EO y sistema de defensa antioxidante**

En el hígado de las ratas tratadas con DRF se registró una disminución significativa en el contenido total de GSH, un aumento de proteínas carboniladas y una disminución significativa en los niveles de expresión génica y proteica de las enzimas del sistema de defensa antioxidante (SOD, catalasa y GR). En cuanto a la actividad enzimática, tanto la SOD total como la catalasa disminuyeron significativamente en estos animales. Estos resultados demuestran y confirman que la DRF reduce la capacidad antioxidante del hígado, disminuyendo simultáneamente la expresión y actividad de las enzimas del sistema de defensa y de antioxidantes no enzimáticos como el GSH (Francini y col., 2010).

La co-administración de  $\alpha$ -AL fue capaz de prevenir los niveles aumentados de proteínas carboniladas e incrementar el contenido total de GSH, así como de restaurar los niveles de expresión génica y proteica de las enzimas del sistema antioxidante. Estos cambios se acompañaron de un aumento en la capacidad antioxidante total del hígado.

Una recuperación similar de los niveles basales de antioxidantes consecutiva a la administración de  $\alpha$ -AL ha sido previamente descrita por Hao y col. (2011) en ratas diabéticas Goto Kakizaki. También se han descrito incrementos en los niveles de GSH tanto con dosis menores (10-100  $\mu$ M) de  $\alpha$ -AL en líneas celulares humanas de linfocitos T, en células gliales y en células de neuroblastoma murino (Busse y col., 1992; Han y col., 1995; 1997), como con dosis mayores (50-80 mg/kg) en ratas UCD-T2DM y ratas Goto Kakizaki (80

mg/kg) (Cummings y col., 2010; Hao y col., 2011). Como se mencionó en materiales y métodos, en nuestro caso la elección de la dosis, la vía de administración y el tiempo de tratamiento se efectuaron en función de obtener una supervivencia del 100% de los animales y sin alteración del peso corporal durante el período de experimentación.

Cabe destacar que en células HSMM (mioblastos de músculo esquelético humano) en las que se silenció la sintasa de AL endógeno (LASY), se registró una disminución significativa del GSH reducido asociado a bajos niveles de AL endógenos, acompañado de disminución de la actividad enzimática de SOD 1, SOD 2 y catalasa; la administración de  $\alpha$ -AL revirtió estos cambios (Padmalayan y col., 2009). En relación a ello, ratones *ob/ob* mostraron una disminución en los niveles de ARNm de LASY en músculo esquelético y tejido adiposo respecto a los animales control (Padmalayan y col., 2009). En nuestro caso, si bien la DRF no indujo modificaciones en la expresión génica de LASY, la administración de AL incrementó significativamente su expresión tanto en animales CL como FL.

Respecto a los niveles de expresión de las enzimas del sistema antioxidante, la administración de  $\alpha$ -AL previno la disminución de los niveles de ARNm de SOD1, catalasa y GR y de los de proteínas de SOD1, SOD2 y catalasa en los animales FL, alcanzando niveles comparables a los del grupo control. Por el contrario, el  $\alpha$ -AL no previno la disminución en la actividad de catalasa y SOD generadas por la DRF, hecho que sugiere que las variaciones en expresión génica, proteica y actividad enzimática no ocurren en el mismo sentido. En conjunto, estos resultados sugieren que, en nuestro modelo, el efecto del  $\alpha$ -AL estaría relacionado a cambios en el sistema de defensa antioxidante no enzimático hepático más que a cambios en la actividad de enzimas como la catalasa y SOD.

Otros autores sin embargo, han registrado una reducción en la actividad de SOD en ratas Goto Kakizaki respecto a ratas Wistar control no diabéticas, que se revirtió por la administración de  $\alpha$ -AL (50 mg/kg día durante 3 meses) (Hao y col., 2011). En el caso de animales tratados con una DRF (60% de la ingesta



calórica durante 20 días), se observó también una reducción en la actividad de las enzimas del sistema de defensa antioxidante SOD, catalasa, GR, GPx, glutatión-S-transferasa y en el contenido de antioxidantes no enzimáticos en hígado y riñón; mientras que el tratamiento con  $\alpha$ -AL elevó significativamente la actividad de estas enzimas y el contenido de antioxidantes no enzimáticos (Thirunavukkarasu y col., 2003; 2004). En contraposición, en ratas con diabetes inducida por inyección de estreptozotocina, el tratamiento con  $\alpha$ -AL (10 ó 50 mg/kg, durante 14 días) disminuyó la actividad enzimática de SOD y catalasa y no modificó la actividad de GPx y GR (Maritim y col., 2003a). Si bien la reducción de la actividad enzimática podría correlacionarse con la reducción del contenido proteico, otros mecanismos podrían estar implicados en la regulación diferencial de ambos procesos. Por ejemplo, en condiciones de hiperglucemia, se ha detectado una inactivación de SOD1 debido a la glicación de un residuo de glicina (Oda y col., 1994); complementariamente, los ROS *per se* son capaces de reducir la actividad de la catalasa y GPx (Datta y col., 2000).

La capacidad del  $\alpha$ -AL y su forma reducida de secuestrar radicales hidroxilo reduciría la necesidad de aumentar la actividad de catalasa (Packer y col., 1995), explicando, al menos parcialmente, la disminución del EO en ratas FL sin que se modifique la actividad de enzimas antioxidantes.

Acorde a lo publicado por Thirunavukkarasu y col. (2003), la administración de  $\alpha$ -AL fue capaz de prevenir el incremento de TBARS séricos inducido por la DRF. En nuestro modelo experimental sin embargo, la dieta no afectó significativamente la peroxidación lipídica hepática, ya que no se detectaron cambios en el contenido de TBARS ni en la susceptibilidad de las membranas a la peroxidación lipídica (Francini y col., 2010). Sí, en cambio, verificamos un incremento significativo de los grupos carbonilo y una disminución en el contenido de GSH, indicadores de un aumento del EO a nivel hepático. Otros autores tampoco han detectado un incremento de TBARS inducido por DRF (Kelley y col., 2004), y se han reportado diferentes impactos de la fructosa sobre el EO en el hígado y sobre otras funciones tisulares

(Brusserolles y col., 2002a; Kelley y col., 2004; Leipnitz y col., 2009; Spolarics y Meyenhofer, 2002).

En conjunto, los datos previos sugieren que el EO inducido por la DRF sería una consecuencia de dos efectos opuestos: un incremento en la producción de ROS y una reducción en la disponibilidad de enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos. Igualmente podemos asumir que el “aparente” bajo impacto del EO sobre el sistema antioxidante específico podría deberse a su mayor contenido de enzimas antioxidantes respecto a otros órganos (Robertson y col., 2004; Tiedge y col., 1998) y a su capacidad de poner en marcha cambios metabólicos capaces de neutralizar la producción excesiva de ROS (Francini y col., 2010).

### **4.3. UCP2 y posible modulación vía PPARs**

Se ha demostrado que eventos asociados a la cadena respiratoria mitocondrial serían los responsables del incremento en la producción de ROS y de su acumulación a nivel celular (Brownlee, 2005). De este modo, una sobrecarga de nutrientes como la provista por el aporte de la DRF, conduciría a la sobreproducción y acumulación de ROS, con el consecuente EO (Francini y col., 2010). Vale recordar que la fructosa, al metabolizarse en el hígado, ingresa directamente a la vía glicolítica a nivel de las triosas fosfato y por lo tanto evita el punto de regulación principal de esa vía catalizado por la PFK-1.

En los animales alimentados con DRF, hemos confirmado que el EO inducido por la dieta promueve una respuesta adaptativa en el hígado que incluye, entre otros mecanismos, un incremento en la expresión de la proteína desacoplante mitocondrial UCP2 y de uno de los factores de transcripción que regula su expresión, PPAR $\delta$ ; sin registrarse cambios en los niveles de ARN y proteína de PPAR $\alpha$ . Estos cambios se acompañaron de una disminución significativa tanto de los niveles de ARNm como de proteína de PPAR $\gamma$  (Castro y col., 2011). La expresión de UCP2 ha sido asociada al estrés metabólico

hepático en ratas adultas (Nakatani y col., 2002) y se ha descrito un aumento de su expresión en condiciones de ayuno, obesidad, deficiencias de leptina y en roedores tratados con dieta rica en grasas (Kersten y col., 1999; Memon y col., 2000; Patsouris y col., 2006).

La sobrecarga metabólica causada por la DRF conduciría a una saturación de la cadena transportadora de electrones y a un aumento en la producción de ROS. Para prevenir este último efecto, se promovería el incremento de la expresión de UCP2 con la consecuente disipación del gradiente de protones, hecho que favorecería una menor producción de ROS (Joseph y col., 2002). Asimismo, varios estudios han relacionado la activación de UCP2 con una hiperglucemia crónica, producción excesiva de superóxido, disminución del potencial de membrana mitocondrial y finalmente alteración de la secreción de insulina estimulada por glucosa (Hribal y col., 2003; Leahy y col., 1992; McQuaid y col., 2006); en relación a este último efecto, se ha postulado que UCP2 cumpliría en las células  $\beta$  un rol fundamental en la regulación de la relación ATP/ADP, en la producción de radical superóxido e, indirectamente, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la secreción de insulina (Newsholme y col., 2007). Esta función podría también ser parte del mecanismo de adaptación a la sobrecarga a nivel hepático.

Cuando se co-administró  $\alpha$ -AL a nuestros animales con DRF, se previno el incremento de los niveles proteicos de UCP2 y PPAR $\delta$ , manteniéndose valores comparables a los registrados en los animales C. Mientras que los cambios en la expresión génica de PPAR $\gamma$  se previnieron, no ocurrió lo mismo con los niveles de su proteína. Es interesante destacar que tanto en el caso de los niveles de ARNm y proteína de UCP2 como de PPAR $\gamma$  donde los cambios ocurren en sentido inverso, es posible asumir que haya otros mecanismos involucrados en su regulación. Kim y col. (2004) demostraron que el suministro de  $\alpha$ -AL a ratas obesas, induce la expresión génica de la UCP1 en tejido adiposo pardo y blanco. Adicionalmente, en islotes aislados de ratas normales, el  $\alpha$ -AL regula la expresión génica y proteica de UCP2 (Shen y col., 2008). Estos datos sugieren

que el efecto del  $\alpha$ -AL sería específico tanto para la isoforma de UCP como para el tejido involucrado.

Respecto al PPAR $\delta$ , el incremento en su expresión génica y proteica en los animales DRF mostró una correlación significativa con el aumento de la expresión de los genes lipogénicos FAS y GPAT, ambos regulados por dicho factor de transcripción (Lee y col., 2006b). Teniendo en cuenta que el  $\alpha$ -AL previno los cambios en los niveles de expresión de PPAR $\delta$  y de ambos genes regulados por éste, podría asumirse que dicho factor de transcripción participaría activamente en el mecanismo por el cual el  $\alpha$ -AL disminuye la hipertrigliceridemia. Apoya esta presunción el hecho que el PPAR $\delta$  regula la sensibilidad a la insulina conduciendo el metabolismo hepático de glucosa hacia la síntesis de lípidos e incrementando la utilización de grasa en el músculo para reducir así la sobrecarga lipídica (Lee y col., 2006b).

En cuanto a la disminución de la expresión de PPAR $\gamma$  registrada en los animales con DRF, previamente se ha demostrado que sus activadores inducen un incremento en la expresión de SOD1 en células endoteliales, lo cual sugiere que lo PPAR $\gamma$  tendrían un rol antioxidante (Inoue y col., 2001). Esta hipótesis apoya nuestros resultados, ya que el  $\alpha$ -AL promovió la expresión de PPAR $\gamma$  y de SOD1. Adicionalmente, otros autores demostraron que la expresión de PPAR $\gamma$  es afectada por el EO en pacientes con síndrome metabólico, detectándose una disminución en su expresión en presencia de EO e hipertrigliceridemia (Macias-Gonzales y col., 2008), condiciones que también están presentes en nuestros animales F. Dichas alteraciones asimismo se han observado en personas obesas que consumieron una dieta rica en grasas (Garcia-Fuentes y col., 2010).

#### **4.4. EO extramitocondrial: rol de la NAD(P)H oxidasa**

Otra fuente de producción de ROS es la NAD(P)H oxidasa, la cual presenta isoformas activas en el hígado (Chabrashvili y col, 2002; Griendling y col., 2000; Guichard y col., 2008; Heitzer y col, 1999; Vaziri y col., 2004). En

nuestros animales alimentados con DRF observamos un incremento significativo en la expresión génica de las subunidades p22<sup>phox</sup> y gp91<sup>phox</sup>, en la expresión proteica de p22<sup>phox</sup>, así como en la actividad de la NAD(P)H oxidasa (Castro y col., 2012). Estos incrementos en la expresión génica de las subunidades constituyentes de la enzima coinciden con los encontrados por otros autores en diferentes órganos y bajo el efecto de diferentes dietas: DRF, sacarosa y/o grasas (Feillet-Coudray y col., 2009; Liu y col., 2010; Roberts y col., 2006). Los resultados obtenidos son compatibles con una producción citosólica de ROS elevada y disfunción de los tejidos afectados y aportaría evidencia acerca del rol activo que juega la NAD(P)H oxidasa en el desarrollo de EO inducido por manipulación alimentaria (Castro y col., 2012; Roberts y col., 2006). Por su parte, Furukawa y col. (2004) postulan que la elevada producción de ROS detectada en ratones obesos KKAy se debe al incremento en la actividad de la NAD(P)H oxidasa y a la alteración del sistema de defensa antioxidante en el tejido adiposo, y que el tratamiento con un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa reduce el EO.

En el caso de los animales FL, se redujo la expresión génica de ambas subunidades y disminuyó significativamente el contenido proteico de p22<sup>phox</sup>. Si bien la activación de la enzima se produce cuando las subunidades citosólicas migran a la membrana plasmática e interactúan con las subunidades catalíticas transmembrana (Stefanska y Pawliczak, 2008), otros autores (Furukawa y col., 2004; Lu y col., 2007) sugieren que la inducción de la expresión génica y proteica estaría asociada con un ambiente pro-oxidante que incrementaría aún más la producción de ROS, tal como el observado en los animales F de nuestro modelo (Castro y col., 2012).

Una hipótesis interesante a plantear se basa en asumir la existencia de un círculo vicioso, donde el EO generado a nivel mitocondrial por la sobrecarga metabólica consecutiva a la administración de una DRF, generaría a nivel citosólico y de membrana plasmática un aumento en la actividad de la NAD(P)H oxidasa, situación que agravaría el escenario de EO. De este modo el  $\alpha$ -AL, al reducir el ambiente pro-oxidante inducido por la DRF, rompería este círculo

vicioso afectando la expresión de la enzima, con la consecuente disminución en la formación de ROS. El nexo entre ambos procesos se relacionaría, tal como se describe más adelante, con cambios metabólicos como aumento de la actividad de la Gl-6-PDH, enzima que genera NAD(P)H. En este sentido cabe mencionar que ratas de 22 a 24 meses de edad (“viejas”), tratadas con  $\alpha$ -AL, reducen los niveles de ARNm de NOX4 y la actividad de la NAD(P)H oxidasa en la aorta, mejorando el EO vascular producido por la edad (Li y col., 2010). Asimismo en ratas hipertensas, la suplementación con AL previene la inducción de la NAD(P)H oxidasa por ciclosporina (Louhelainen y col., 2006); igualmente en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, el  $\alpha$ -AL revierte el incremento de p22<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup> en el riñón de estos animales (Bhatti y col., 2005). Sin embargo, tanto estos trabajos como el nuestro, no permiten descartar un efecto directo del  $\alpha$ -AL sobre la NAD(P)H oxidasa.

#### **4.5. Marcadores de inflamación**

Otra característica del modelo empleado es la inducción de un cuadro de inflamación. En nuestro caso, la administración de una DRF indujo la expresión de marcadores de inflamación, tales como el incremento de la expresión génica de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  y PAI-1, acompañados de aumento en los niveles proteicos de TNF $\alpha$ , sin registrarse modificaciones significativas en los niveles de ARNm de NF $\kappa$  $\beta$  y proteicos de I $\kappa$  $\beta$  $\alpha$  (factor regulador de su expresión). A su vez, la presencia de estas citoquinas proinflamatorias estuvo asociada a una mayor expresión proteica de COX2.

En ratones en los que se indujo un estado de inflamación crónica por activación hepática de NF $\kappa$  $\beta$ , se detectó IR moderada, que se mejoró al neutralizarse la IL6 (Cai y col., 2005). Por su parte, Furukawa y col. (2004) demostraron que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la expresión de PAI-1, TNF $\alpha$  e IL6 y reduce los niveles de ARNm de PPAR $\gamma$  en adipocitos 3T3. Cabe mencionar que la sensibilidad a la insulina no mejoró en personas obesas o diabéticas cuando se les administraron anticuerpos anti-TNF $\alpha$  o antagonistas del mismo (Bernstein y col.,

2006; Ofei y col., 1996; Paquot y col., 2000). Sí se registró, en cambio, una reducción del depósito hepático de grasa en ratones con *knock-out* del receptor de TNF $\alpha$  alimentados con fructosa (30%); estos datos sugerirían que dicha citoquina estaría mediando la lipogénesis hepática con inducción del ARNm de PAI-1 (Kanuri y col., 2011b). Aunque no es claro el mecanismo por el cual el TNF $\alpha$  llevaría a cabo esta acción, en nuestros animales F se registró un incremento de su expresión tanto génica como proteica asociado a esteatosis hepática.

El tratamiento con  $\alpha$ -AL previno el aumento de los niveles de ARNm de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  y PAI-1 y de proteína de TNF $\alpha$  y COX2, lo que indicaría que el  $\alpha$ -AL sería capaz de prevenir el desarrollo del estado de inflamación registrado a nivel hepático en nuestras ratas alimentadas con DRF. El efecto antiinflamatorio del  $\alpha$ -AL ha sido previamente demostrado por Tian y col. (2012), quienes encontraron que a nivel hepático, el  $\alpha$ -AL es capaz de disminuir la expresión génica de TNF $\alpha$  e IL1 inducidas por administración de lipopolisacáridos. También se detectó dicho efecto en el tejido adiposo de ratones obesos con IR (Deiuliis y col., 2011). Igualmente, otros autores han reportado que en células HMEVC (células endoteliales microvasculares humanas) y HSMM (mioblastos de músculo esquelético humanos) incubadas con altas concentraciones de TNF $\alpha$ , se registró una disminución de los niveles de ARNm de LASI, mientras que la administración de  $\alpha$ -AL atenuó el estado inflamatorio (Padmalayan y col., 2009). Nuestros resultados no permiten afirmar si el efecto antiinflamatorio del  $\alpha$ -AL es un efecto directo o es consecuencia de la reducción del EO.

#### **4.5. Metabolismo de carbohidratos**

Respecto al metabolismo de carbohidratos, en los animales con DRF se detectó un incremento en los niveles de ARNm, proteína y actividad enzimática de FQ. Como se mencionó en la introducción, esta enzima está presente en cantidades significativas sólo en el hígado y es una de las tres enzimas que le otorgan a esta glándula la capacidad intrínseca de metabolizar fructosa en forma casi exclusiva (Heinz y col., 1968; Mayes, 1993). Asimismo, en los animales F

se detectó mayor contenido de glucógeno hepático e incremento de la vía de las pentosas (incremento en los niveles de ARNm y aumento de actividad de la Gl-6-PDH) y del ciclo de sustrato de glucosa (incremento simultáneo de la actividad de GQ y Gl-6-Pasa) respecto al grupo C (Francini y col., 2009, 2010).

En el año 2008, Ouyang y col. demostraron que pacientes con NAFLD consumían una cantidad significativamente mayor de bebidas edulcoradas (con jarabes ricos en fructosa) respecto a individuos sanos. Los autores también destacan que la FQ (medida en biopsias hepáticas de estos pacientes), enzima clave en el inicio del metabolismo de fructosa en el hígado, se incrementa dos veces respecto a la población general. En el mismo trabajo se demuestra que la fructosa induce la expresión génica, proteica y la actividad de FQ en hepatocitos cultivados. Este incremento coincide con lo reportado por otros investigadores para el hígado de ratas alimentadas con DRF (Burant y Saxena, 1994; Korieh y Crouzoulon, 1991).

El aumento en la actividad de Gl-6-PDH, primera enzima y limitante de la vía de las pentosas monofosfato, proveería al hígado de un mecanismo adicional para neutralizar al EO, ya que por su acción disminuye el aporte de sustratos a la mitocondria (Spolarics y col., 2000) y aumenta el poder reductor por incremento en la producción de NAD(P)H. Este último es importante tanto para los procesos de síntesis reductivas como la biosíntesis de ácidos grasos y esteroides, como para la reducción del GSSG a GSH mediante la acción de la enzima GR. Sin embargo, el NAD(P)H también es el sustrato de la enzima NAD(P)H oxidasa, cuya actividad aumenta la formación de ROS. Por lo tanto, la actividad de la Gl-6-PDH observada en nuestro modelo tendría una acción dual: por un lado desviaría sustratos de la vía oxidativa mitocondrial y por otro promovería el círculo vicioso planteado inicialmente, que relaciona EO mitocondrial con EO citosólico.

Como ya mencionáramos, la DRF induce un aumento en la actividad de la enzima GQ, la cual juega un rol fundamental en la regulación del metabolismo de glucosa a nivel hepático (Iynedjian, 1993; Magnuson, 1990; Matschinsky,



1996). Un aumento similar en la actividad de esta enzima ha sido registrado en ratas obesas (Belfiore y col., 1989) y en ratas Zucker (obesas e hiperinsulinémicas) (Huuponen y col., 1989). En nuestro caso, el aumento en la actividad de la enzima no se acompañó de un aumento significativo en los niveles de expresión génica y proteica de la misma, lo que sugiere que mecanismos postranscripcionales serían los responsables del aumento de su actividad. Cabe destacar que en las ratas F, la mayor actividad de la enzima se registró en su fracción citosólica hepática respecto a la nuclear. Estos datos sugieren que la translocación de la enzima desde el núcleo, donde se encuentra secuestrada en su forma inactiva por la proteína reguladora de GQ, al citosol, donde la enzima adquiere su forma activa, sería uno de los mecanismos afectados por la sobrecarga con fructosa.

Otro mecanismo potencialmente responsable del aumento de actividad citosólica de la enzima sería la interacción de la GQ con PFK-2 (Francini y col., 2009), proteína involucrada en la regulación de la actividad de GQ (Massa y col., 2004). La PFK-2 es la enzima encargada de la formación y degradación de fructosa-2,6-bisfosfato, importante regulador del metabolismo de carbohidratos (Claus y col., 1984; Okar y col., 2001; Pilkis y col., 1995). Massa y col. (2004) demostraron que la sobreexpresión de PFK-2 en células RINm5F-GK y en células INS1 produjo un aumento en la actividad catalítica de GQ; dicho incremento se debería a un mecanismo postraduccional, ya que los niveles de proteína permanecieron constantes en comparación con los controles. Dicho trabajo también demostró que la activación de la GQ por sobreexpresión de PFK-2 indujo una mayor tasa de oxidación de glucosa. *In vivo*, en ratones diabéticos, se observó que la transfección de PFK-2 en hígado indujo un aumento en los niveles de ARNm y proteína de GQ (Wu y col., 2004). Experimentos realizados en híbridos de levaduras demostraron que la GQ interactúa con PFK-2 a través del dominio fosfatasa de esta última (Baltrusch y col., 2001); dicha interacción es un prerrequisito para lograr la activación ya que el proceso es bloqueado por un anticuerpo específico contra el dominio fosfatasa de PFK-2 (Massa y col., 2004). La interacción de PFK-2 con GQ la activa y le da estabilidad en el citoplasma

(Agius y col., 1993). A nivel hepático, este complejo promovería de modo coordinado el incremento en la fosforilación de la glucosa (por activación de GQ) y de la glucólisis (por PFK-2) (Smith y col., 2007). La sobreexpresión de PFK-2 en hepatocitos potencia la expresión de GQ, y su fosforilación/defosforilación modula su capacidad de unirse a GQ, afectando así su translocación desde el núcleo al citoplasma (Payne y col., 2005). Del mismo modo, en ratones con diabetes inducida por estreptozotocina, la expresión de PFK-2 en el hígado indujo una reducción en la producción de glucosa hepática al estimular la glucólisis e inhibir la gluconeogénesis, con disminución de la glucemia (Wu y col., 2001).

En nuestro caso, la expresión génica y proteica de PFK-2 aumentó en los animales alimentados con DRF, hecho que sugiere que este mecanismo participaría activamente en el incremento de la actividad de GQ en nuestras ratas con DRF: la fructosa induciría la translocación de la enzima al citosol, donde interaccionaría con PFK-2, con el consiguiente aumento de su actividad.

Los resultados obtenidos con  $\alpha$ -AL en animales sometidos a DRF, donde se previenen las modificaciones inducidas por la fructosa, sugieren que el EO participaría activamente en la regulación de la actividad de GQ.

Si bien la insulina es un estimulador de la expresión génica de la GQ vía PI3K (Iynedjian, 1993; 2009), en nuestros animales hiperinsulinémicos corroboramos que tal incremento no llega a ser significativo, posiblemente debido a la IR que presentan estos animales.

A nivel molecular se ha demostrado que el factor de transcripción SREBP 1c induciría la expresión de GQ estimulada por insulina (Foretz y col., 1999; Guillet-Deniau y col., 2002; Kim y col., 1998; Sewter y col., 2002). En hepatocitos primarios, la sobreexpresión de SREBP 1c se acompaña de un incremento en el ARNm de GQ, mientras que un mutante dominante negativo de dicho factor de transcripción inhibe la inducción de la expresión génica de GQ estimulada por insulina (Foretz y col., 1999). En nuestro caso, si bien tanto los niveles proteicos de PI3K, como la expresión génica de SREBP 1c están

aumentados en las ratas con DRF, no registramos un aumento en la expresión génica de la GQ, lo cual refuerza la hipótesis de que el incremento observado en la actividad de la enzima es consecuencia de cambios en mecanismos de regulación postranscripcionales: translocación núcleo-citosol y posible interacción con PFK-2.

En ratones transgénicos, la sobreexpresión de GQ induce IR, hipertrigliceridemia y TGA (Ferre y col., 2003), mientras que en ratas normales se observó que la sobreexpresión de Gl-6-Pasa indujo los mismos efectos (Trinh y col., 1998); en consecuencia, el aumento de estas dos enzimas de la vía glicolítica podría mediar, al menos en parte, la IR observada en nuestras ratas tratadas con DRF.

La administración de DRF a ratas normales indujo un aumento significativo del depósito hepático de glucógeno y en la expresión génica y actividad de la Gl-6-Pasa. Estos resultados están en sintonía con los hallados por otros autores: Frame y Cohen (2001) demostraron en ratas tratadas con una dieta rica en sacarosa (68% de las calorías totales) un incremento en la expresión génica de Gl-6-Pasa, acompañado de disminución en la expresión génica de GSK3, serina-treonina quinasa encargada de fosforilar e inactivar a la glucógeno sintasa. Por otro lado, en ratas alimentadas con fructosa, se observó un incremento en la captación y fosforilación de glucosa hepática y en la síntesis de glucógeno (Shiota y col., 1998; Van Schaftingen y Vandercammen, 2004). Un fenómeno similar se registró en ratas alimentadas con sacarosa (68% de la ingesta calórica): incremento de la gluconeogénesis y de la glucogenogénesis hepática (Bizeau y col., 2001; Pagliassotti y col., 1994, 1995). También se ha detectado un incremento del depósito hepático de glucógeno (Clare y col., 1992) y de TG (Lonardo y col., 2005) en pacientes diabéticos. El incremento simultáneo del depósito de glucógeno, de la activación de la Gl-6-Pasa y de la GQ podrían interpretarse como mecanismos adaptativos del hepatocito frente a la sobrecarga de fructosa para desviar el aporte mitocondrial de sustratos oxidables y así disminuir la formación de ROS.

La activación simultánea de la Gl-6-Pasa y la GQ, dos enzimas que participan en la interconversión de dos compuestos (Gl-6-P y glucosa) sin cambios netos más allá de la disipación de energía, determinan lo que se denomina un ciclo fútil o ciclo de sustrato, causal de la hidrólisis del ATP sin cambios en la concentración de los reactantes. Sin embargo, este mecanismo no necesariamente es fútil y podría significar otro mecanismo complementario para desviar sustratos hacia su oxidación. Cabe consignar que un ciclo similar al observado en nuestros animales F se ha descrito en células  $\beta$  pancreáticas de roedores con DMT2 (Khan y col., 1994).

Las mencionadas alteraciones a nivel del metabolismo de carbohidratos se revirtieron mediante la administración de  $\alpha$ -AL.

Estudios experimentales demostraron que el  $\alpha$ -AL estimula el metabolismo oxidativo y no oxidativo de la glucosa en ratas diabéticas y normales (Singh y Bowman, 1970). También mejoró el depósito de glucosa en tejidos periféricos en ratas alimentadas con glucosa (Midaoui y de Champlain, 2002), en pacientes con DMT2 (Jacob y col., 1995) y en ratas obesas Zucker (Jacob y col., 1992). El tratamiento con  $\alpha$ -AL (100 mg/kg durante 10 días) mejoró la captación de glucosa mediada por insulina, su oxidación y la síntesis de glucógeno, y disminuyó los niveles plasmáticos de insulina y ácidos grasos en ratas con IR (Jacob y col., 1996). Resultados similares se hallaron en pacientes con DMT2 tratados con  $\alpha$ -AL vía oral (Jacob y col., 1999).

El  $\alpha$ -AL favorecería la translocación de los transportadores GLUT-1 y GLUT-4 a la membrana plasmática (Estrada y col., 1996). En ratas UCD-T2DM, el consumo de fructosa (20% de la ingesta energética) acelera el inicio de la diabetes, mientras que el tratamiento con  $\alpha$ -AL (80 mg/kg) la previno al mejorar la homeostasis de la glucosa (Cummings y col., 2010). Por otra parte, incubando hepatocitos de rata en presencia de  $\alpha$ -AL, se observó una inhibición dosis dependiente de la gluconeogénesis como consecuencia del secuestro de la coenzima A mitocondrial (Blumenthal, 1984). A su turno, la disminución de la acetil-CoA aceleraría la captación de glucosa e incrementaría la glucólisis

(Haugaard y Haugaard, 1970; Singh y Bowman, 1970); la formación de lipoil-CoA reduciría los niveles de HSCoA y acetilCoA disminuyendo la síntesis de citrato que en consecuencia no produciría la inhibición de la PFK-1 y favorecería también el flujo glucolítico. Esta combinación de efectos (interferencia en la producción de glucógeno y aumento de glucólisis) llevan a una reducción extrema en la síntesis hepática de glucógeno (Blumenthal, 1984).

#### **4.6. Metabolismo de lípidos**

Los cambios descritos en el metabolismo de carbohidratos en los animales alimentados con DRF se acompañaron de un incremento simultáneo del depósito graso y contenido hepático de TG. Estos resultados sugieren que estos animales canalizan parte del exceso de sustratos a través de la síntesis de lípidos, fenómeno evidenciado por el incremento en el ARNm de las enzimas lipogénicas FAS y GPAT y de los factores de transcripción SREBP 1c y ChREBP que regulan la expresión génica de dichas enzimas (Bennett y col., 1995; Dentin y col., 2005; Koo y col., 2009).

Se ha observado que mientras la glucosa induce un pico en la actividad de SREBP 1c, la fructosa estimula su actividad de modo gradual, sugiriendo que la lipogénesis depende más de la disponibilidad de carbohidratos y particularmente fructosa, que del estímulo de insulina (Matsuzaka y col., 2004); esto último explicaría el efecto lipogénico registrado en nuestras condiciones experimentales donde los animales presentan IR.

Por su parte, el factor de transcripción ChREBP regula directamente la expresión de FAS en respuesta a dietas ricas en carbohidratos (fructosa y sacarosa), no así en respuesta a la glucosa (Janevski y col., 2012). En ratones *knock-out* para el gen ChREBP se observó una intolerancia a la dieta con fructosa, hecho que sugiere su rol fundamental en la regulación de la lipogénesis hepática (Iizuka y col., 2004). También se encontró que la fructosa incrementa los niveles de ARNm de FAS, quizás al estabilizarlo, mientras que los

carbohidratos en general aumentan su tasa transcripcional (Katsurada y col., 1990).

Huang y col. (2011) demostraron, en células de hepatoma humano (HepG2) expuestas a concentraciones variables de fructosa y en ratones alimentados con fructosa (60% de las calorías totales), un incremento en el contenido de TG hepáticos, con aumento de la lipogénesis *de novo*. Asimismo, Miyazaki y col. (2004) registraron un incremento en la isoforma hepática de SREBP 1 y en la expresión génica de enzimas lipogénicas como FAS y ACC en ratones tratados durante 7 días con una DRF (70%). En ratas alimentadas con DRF también se detectó la inducción de FAS, incremento en la secreción de TG e hipertrigliceridemia, mientras que una dieta rica en glucosa no provocó dichas alteraciones (Kazumi y col., 1997). Estos resultados concuerdan con lo hallado por Matsuzaka y col. (2004) respecto a la estimulación de la actividad de SREBP 1c por fructosa. La hipertrigliceridemia descrita sería consecuencia de la combinación de dos fenómenos: la sobreproducción de TG y la depuración inapropiada de TG (Kazumi y col., 1986; Parks y Hellerstein, 2000), esta última debido a una disminución en la actividad de lipoproteína lipasa (Quaschnig y col., 1999).

Nuestros resultados sugieren que también los PPARs podrían estar involucrados en el efecto lipogénico de la DRF. En ese sentido, es conocido el papel regulador de PPAR $\gamma$  sobre la expresión génica de SREBP 1c (König y col., 2009). Varios autores han encontrado una relación directa entre los agonistas de PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$  y la disminución en la concentración de TG plasmáticos y hepáticos en ratas (König y col., 2007; Lee y col., 2004; Naderali y col., 2004). En células Fao de hepatoma de rata, el PPAR $\gamma$  estimuló la expresión génica de Insig-2, lo cual se asoció a una reducción en la forma transcripcionalmente activa de SREBP 1, ARNm de GPAT y FAS, reflejado en una disminución del contenido y secreción de TG (König y col., 2009). Acorde a lo descrito, en nuestras ratas alimentadas con DRF se registró una disminución en la expresión génica y proteica de PPAR $\gamma$  y consecuentemente, un incremento en los niveles de ARNm de SREBP 1c, GPAT y FAS.

Por otro lado, la co-administración de  $\alpha$ -AL fue capaz de prevenir los cambios en los niveles de ARNm de los mencionados genes con disminución del depósito graso a nivel hepático y de la hipertrigliceridemia; estos datos sugieren que el  $\alpha$ -AL produce su efecto, al menos parcialmente, normalizando la síntesis hepática *de novo* de TG. Acorde con nuestros resultados, se ha observado que en ratones con sobreexpresión transgénica de acetyl-CoA sintetasa, el  $\alpha$ -AL reduce la expresión génica de FAS y SREBP 1c (Lee y col., 2006a) y que en el hígado de ratas reduce la actividad y expresión génica de enzimas lipogénicas (Horton y col., 2002; Huong e Ide, 2008). Asimismo, Butler y col. (2009) demostraron que el tratamiento con  $\alpha$ -AL mejora la hipertrigliceridemia en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, debido al aumento de la depuración de triacilglicerol y la *down-regulation* de la secreción de TG hepáticos; efecto este último debido en parte a la inhibición de su síntesis *de novo*. Valdecantos y col. (2012) demostraron que el  $\alpha$ -AL es capaz de reducir la lipogénesis y estimular la  $\beta$ -oxidación hepática inducidas por una dieta rica en grasas. Igualmente, empleado diversas dosis de  $\alpha$ -AL (1 a 5 g/kg por día), se registraron descensos de tipo dosis-dependiente en la concentración de TG hepáticos y de colesterol, con disminución de la actividad de enzimas lipogénicas (FAS y Gl-6-PDH), así como de la PK (Huong e Ide, 2008), la cual participa en la regulación de la síntesis de ácidos grasos (Noguchi y col., 1982).

#### **4.7. Vía de señalización de la insulina**

En nuestras ratas alimentadas con DRF, registramos un incremento en los niveles proteicos del RI y de PI3K y una disminución de IRS1 e IRS2. Hallamos una reducción significativa en los niveles de fosforilación en tirosina de RI e IRS1. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de IRS1 e IRS2. La co-administración de  $\alpha$ -AL previno el desarrollo de estas alteraciones en la cascada de señalización de insulina.

Sin embargo en 1984, Bieger y col. demostraron que el incremento en los TG plasmáticos puede disminuir el número de RI, reduciendo así la sensibilidad

a la hormona, y en 1989 Thorburn y col. plantearon una relación entre hipertrigliceridemia e IR. Lee y col. (2005) demostraron que el  $\alpha$ -AL mejoraría la sensibilidad a la insulina al disminuir los depósitos ectópicos de TG y aumentar la expresión de AMPK.

Ratones *knock out* para el RI hepático exhiben IR, TGA y una falla en la supresión de la producción de glucosa (Michael y col., 2000). Asimismo, la infusión de altas dosis de insulina en estos ratones no suprimió la producción de glucosa, demostrando que los efectos directos e indirectos de la insulina requieren que su vía de señalización permanezca intacta (Fisher y Kahn, 2003). Otro estudio también demostró que el IRS2 es necesario para la acción eficiente de la insulina en el hígado (Dong y col., 2006).

Por otra parte, en modelos animales de DMT2 con obesidad como los ratones *ob/ob*, la evidencia muestra alteraciones en etapas tempranas de la cascada de mediadores de insulina (Exton, 1990; Lord y col., 1985; Saad y col., 1992; Soll y col., 1975; Taberner y col., 1991). Así, por ejemplo, en ratones obesos diabéticos se detectó una disminución del 50% en la fosforilación del RI y un 80% en el IRS1. Estos efectos se asociaron a una disminución del 90% en la actividad de PI3K inducida por insulina (Folli y col., 1992).

Se ha demostrado que la acumulación de lípidos a nivel hepático en animales alimentados con fructosa afecta la señalización post-receptor de la insulina generando IR hepática (Pagliassotti y col., 1996, 2002). Acorde con estos resultados, ratas alimentadas con fructosa (66%) durante dos semanas presentaron una disminución en los niveles de ARNm y proteína del RI en hígado y músculo esquelético, acompañada de hipertrigliceridemia (Catena y col., 2003).

Estos efectos no serían condicionados sólo por la concentración de estas proteínas sino también por su grado de fosforilación. Así, por ejemplo, en ratas tratadas con sacarosa (68 % de la ingesta calórica), no se hallaron cambios en la fosforilación en tirosina del RI estimulada por la hormona, pero sí una disminución en la fosforilación en residuos tirosina del IRS1 e IRS2, de la



asociación de ambos con la subunidad p85 de la PI3K, de la actividad de PI3K y de la fosforilación de Akt. Estos resultados confirman el efecto modulador de la dieta sobre la señalización de insulina a nivel hepático (Wei y col., 2007). En otros estudios con ratas alimentadas con fructosa (624g/kg de comida) durante 28 días, no se registraron cambios en la concentración del RI, pero sí una disminución del 72% en su fosforilación estimulada por insulina, seguida de una reducción en la fosforilación en residuos tirosina del IRS1 e IRS2 en hígado y músculo (Bezerra y col., 2000; Ueno y col., 2000).

Igualmente se verificó, en ratas alimentadas con una dieta rica en sacarosa (68% de la ingesta calórica) durante una, dos o cinco semanas, un incremento en la fosforilación en serina del IRS1 (Wei y col., 2004). Lo mismo ocurrió en hepatocitos expuestos a glucosa y fructosa, en presencia o ausencia de insulina (Wei y col., 2005). Por otra parte, en hepatocitos aislados de ratas alimentadas con sacarosa (68% de la ingesta calórica), se registró una disminución de la fosforilación en tirosina del IRS1 estimulada por insulina (Wei y Pagliassotti, 2004). Este efecto sobre la fosforilación en tirosina del IRS1 e IRS2 también se observó en hepatocitos expuestos a glucosa y fructosa (Wei y col., 2005). En conjunto, estos resultados, al igual que los nuestros, demuestran que la fructosa reduce la fosforilación en tirosina del IRS1 en respuesta a insulina, así como la habilidad del IRS1 para asociarse con el RI, inhibiendo así la cascada de señalización y la acción de la insulina (Aguirre y col., 2002; Hotamisligil y col., 1996; Paz y col., 1997).

También se ha comprobado que el TNF $\alpha$  promueve la fosforilación inhibitoria en residuos serina del IRS1 (Aguirre y col., 2000; Hotamisligil y col., 1996; Yin y col., 1998). En relación a ello, se observó que el agregado de TNF $\alpha$  recombinante a células en cultivo o su administración a animales, disminuye el efecto de la insulina. Igualmente se ha descrito que animales obesos (ratones *ob/ob* y ratas *fa/fa*), carentes de TNF $\alpha$  funcional o de receptores para TNF $\alpha$ , tienen mayor sensibilidad a la insulina que sus controles (Hotamisligil y col., 1993; Uysal y col., 1997). Del mismo modo, en ratones *knock out* para el gen de IL1 $\alpha$ , se registraron glucemias e insulinemias de ayuno más bajas que en los

animales control (Matsuki y col., 2003). También se ha observado que la IL1 $\beta$  es capaz de reducir la expresión de IRS1 a nivel transcripcional y postranscripcional (Jager y col., 2007).

Estos datos, junto a los obtenidos en nuestro estudio, demuestran que los nutrientes son moduladores importantes de la activación de las vías de estrés e inflamación y la inducción de IR hepática (Evans y col., 2005; Wei y Pagliassotti, 2004).

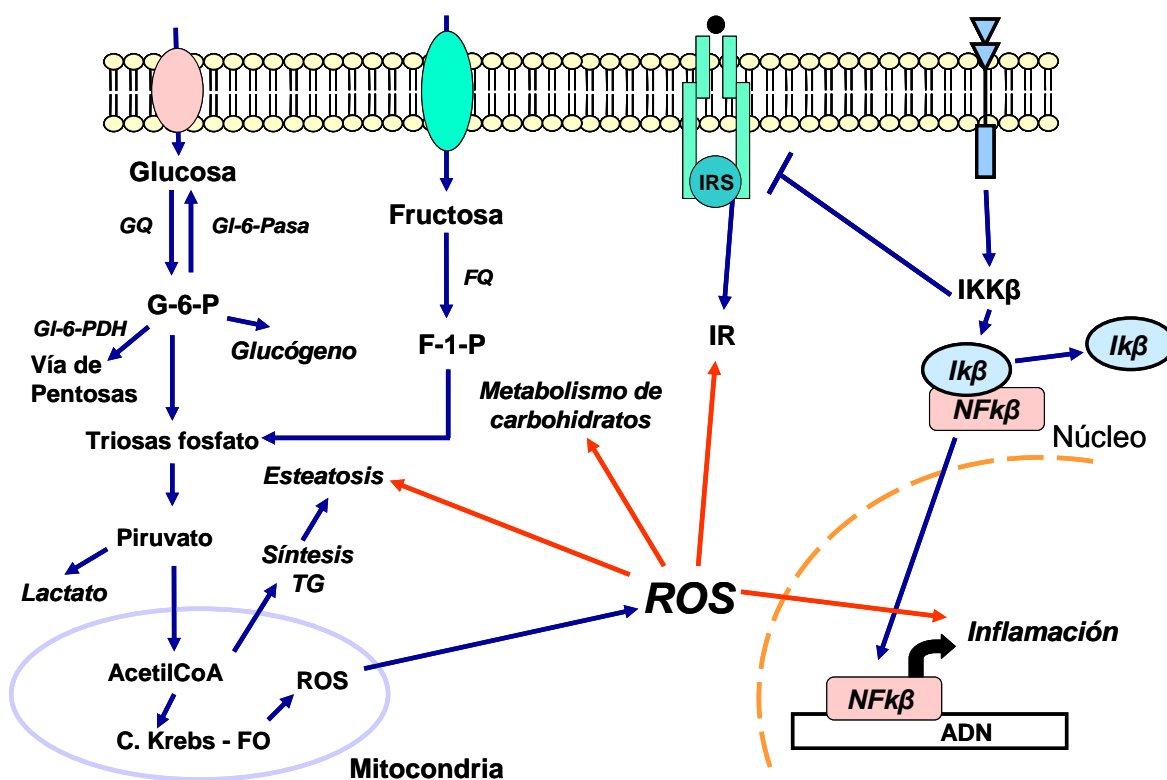
Cabe consignar que Bloch-Damti y col. (2006) observaron que el EO induce un incremento en la fosforilación en residuos serina del IRS1 e IRS2 en adipocitos 3T3-L1, causando IR. De este modo el EO tendría un rol fundamental en el desarrollo de la IR. Acorde con esta hipótesis, se ha demostrado que la administración de  $\alpha$ -AL a animales o a pacientes con IR mejora la sensibilidad a la insulina (Jacob y col., 1995). También se ha observado que inductores del EO disminuyen *in vitro* el transporte de glucosa estimulado por insulina y la translocación de GLUT-4 (Rudich y col., 1998). Por el contrario, la administración de  $\alpha$ -AL mejoraría la sensibilidad a la insulina favoreciendo la autofosforilación del RI y la oxidación de los grupos tioles presentes en la subunidad  $\beta$  del receptor mediada por la forma oxidada del  $\alpha$ -AL (Moini y col., 2002). Aportando evidencia adicional respecto al rol central del EO en la IR, se ha demostrado que la expresión del gen de insulina requiere de ciertos factores de transcripción activados por GSH (Araki y col., 1991).

#### **4.8. Conclusiones**

1. La alimentación de ratas Wistar adultas normales con una DRF durante tres semanas induce hipertrigliceridemia, normogluceemia con hiperinsulinemia y por lo tanto IR, TGA, aumento de marcadores de EO e inflamación y alteraciones en el metabolismo hepático de lípidos y glúcidos. Estas alteraciones remedan las presentes en el síndrome metabólico humano y por lo tanto convierten a la DRF en un buen modelo para su estudio.
2. En los animales alimentados con DRF, los cambios metabólicos observados representarían un mecanismo de adaptación a la sobrecarga de sustratos metabólicos, mediante el cual el hígado redirige su metabolismo oxidativo a una vía no oxidativa, resultando en una provisión menor de combustibles a la mitocondria con la consecuente disminución en la producción de ROS.
3. El aumento de la vía de las pentosas y en consecuencia de la generación de NAD(P)H, activaría a la NAD(P)H oxidasa, estableciéndose así un círculo vicioso en la generación de EO.
4. La administración de DRF conduce a cambios en la expresión de PPARs y estos a su vez promoverían cambios en la expresión de UCP2. El aumento de UCP2 sería un mecanismo alternativo tendiente a atenuar la formación de ROS en estos animales.
5. La sobreexposición a la fructosa conduce a la desregulación del metabolismo lipídico que conduciría a la IR, debido, en parte, a la desregulación hepática de las vías de estrés e inflamación.
6. La administración de un antioxidante,  $\alpha$ -AL, disminuye la expresión de marcadores de EO, normaliza la disfunción metabólica y mejora la sensibilidad a la insulina. Asimismo, el  $\alpha$ -AL fue capaz de prevenir el desarrollo del estado de inflamación hepático inducido por la DRF.

7. Estos datos sugieren que la formación de ROS y el consecuente EO podrían ser los eventos causales iniciales que desencadenan la disfunción metabólica hepática, la IR y la reacción inflamatoria.
8. En función de estos resultados, el uso de antioxidantes podría ser una estrategia útil para la prevención y tratamiento de la DMT2 y otros factores de riesgo cardiovascular desencadenados por el consumo de dietas desbalanceadas.

La siguiente figura resume los mecanismos propuestos a través de los cuales los ROS provocarían alteración del metabolismo de carbohidratos y de lípidos, inflamación y finalmente IR.



## ***BIBLIOGRAFÍA***

---

Agius L, Peak M. *Intracellular binding of glucokinase in hepatocytes and translocation by glucose, fructose and insulin*. *Biochem J* 1993, 296:785-796.

Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. *The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307)*. *J Biol Chem* 2000, 275:9047-9054.

Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. *Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action*. *J Biol Chem* 2002, 277:1531-1537.

Alzamendi A, Giovambattista A, Raschia A, Madrid V, Gaillard RC, Rebolledo O, Gagliardino JJ, Spinedi E. *Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats*. *Endocrine* 2009, 35:227-232.

American Diabetes Association. *Clinical Practice Recommendations 2005*. *Diabetes Care* 2005, 28:S1-S79.

American Diabetes Association. *Clinical Practice Recommendations 2007*. *Diabetes Care* 2007, 30: S1:S3.

Amudha G, Josephine A, Varalakshmi P. *Role of lipoic acid in reducing the oxidative stress induced by cyclosporine A*. *Clin Chim Acta* 2006, 372:134-139.

Androne L, Gavan NA, Veresiu LA, Orasan R. *In vivo effect of lipoic acid on lipid peroxidation in patients with diabetic neuropathy*. *In Vivo* 2000, 14:327-330.

Anuradha CV, Balakrishnan SD. *Taurine attenuates hypertension and improves insulin sensitivity in fructose-fed rats, an animal model of insulin resistance*. *Can J Physiol Pharmacol* 1999, 77:749-754.

Araki E, Murakami T, Shirotani T, Kanai F, Shinohara Y, Shimada F, Mori M, Shichiri M, Ebina Y. *A cluster of four Sp1 binding sites required for*

*efficient expression of the human insulin receptor gene.* J Biol Chem 1991, 6:3944-3948.

Arivazhagan P, Thilakavathy T, Ramanathan K, Kumaran S, Panneerselvam C. *Effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid on the status of lipid peroxidation and protein oxidation in various brain regions of aged rats.* J Nutr Biochem 2002, 13:619-624.

Armutcu F, Coskun O, Gürel A, Kanter M, Can M, Ucar F, Unalacak M. *Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats.* Clin Biochem 2005, 38:540-547.

Arner P, Pollare T, Lithell H, Livingston JN. *Defective insulin receptor tyrosine kinase in human skeletal muscle in obesity and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus.* Diabetologia 1987, 30:437-440.

Assy N, Nasser G, Kamayse I, Nseir W, Beniashvili Z, Djibre A, Grosovski M. *Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors.* Can J Gastroenterol 2008, 22:811-816.

Atlas International Diabetes Federation, 4<sup>th</sup> end, IDF, Brussels (<http://www.eatlas.idf.org>).

Backer JM, Myers Jr MG, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlesinger J, White MF. *The phosphatidylinositol 3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation.* EMBO J 1992, 11:3469-3479.

Baltrusch S, Lenzen S, Okar DA, Lange AJ, Tiedge M. *Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library: identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel interaction partner.* J Biol Chem 2001, 276:43915-43923.

Bantle J, Raatz S, Thomas W, Georgopoulos A. *Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects.* Am J Clin Nutr 2000, 72:1128-1134.

Bast A, Haenen GRMM. *Regulation of lipid peroxidation by glutathione and lipoic acid; involvement of liver microsomal vitamin E free radical reductase*. Antioxidant in therapy and preventive medicine, New York, Plenum Press, 1990, 111-116.

Baynes JW. *Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes*. Diabetes 1991, 40:405-412.

Belfiore F, Romeo F, Iannello S, Salamone C. *The glucose-6-phosphatase/glucokinase ratio in the liver of obese-diabetic subjects*. Biochem Med Metab Biol 1989, 41:77-80.

Bennet MK, Lopez JM, Sanchez HB, Osborne TF. *Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways*. J Biol Chem 1995, 270:25578-25583.

Beraza N, Malato Y, Vander Borgh S, Liedtke C, Wasmuth HE, Dreano M, de Vos R, Roskams T, Trautwein C. *Pharmacological IKK2 inhibition blocks liver steatosis and initiation of non-alcoholic steatohepatitis*. Gut 2008, 57:655-663.

Bergheim I, Weber S, Vos M, Kramer S, Volynets V, Kaserouni S, McClain CJ, Bischoff SC. *Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin*. J Hepatol 2008, 48:983-992.

Bergman RN. *Toward physiological understanding of glucose tolerance: minimal model approach*. Diabetes 1989, 38:1512-1527.

Bergman RN. *Non-esterified fatty acids and the liver: why is insulin secreted into the portal vein?* Diabetologia 2000, 43: 946-952.

Bergman RN, Steil GM, Bradley DC, Watanabe RM. *Modeling of insulin action in vivo*. Ann Rev Physiol 1992, 54:861-883.

Bernstein LE, Berry J, Kim S, Canavan B, Grinspoon SK. *Effects of etanercept in patients with the metabolic syndrome*. Arch Intern Med 2006, 166:902-908.



Beutler E. *Red cell metabolism*. A manual of Biochemical Methods, Grune Strottan, NY 1975, 67-69.

Bezerra RMN, Ueno M, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CRO, Saad MF. *A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats*. J Nutr 2000, 130:1531-1535.

Bhatti F, Mankhey RW, Asico L, Quinn MT, Welch WJ, Maric C. *Mechanisms of antioxidant and pro-oxidant effects of alpha-lipoic acid in the diabetic and nondiabetic kidney*. Kidney Int 2005, 67:1371-1380.

Bieger WP, Michael G, Barwich D, Wirth A. *Diminished insulin receptors on monocytes and erythrocytes in hypertriglyceridemia*. Metabolism 1984, 33:982-987.

Bizeau ME, Pagliassotti MJ. *Hepatic adaptations to sucrose and fructose*. Metabolism 2005, 54:1189-1201.

Bizeau ME, Thresher JS, Pagliassotti MJ. *A high-sucrose diet increases gluconeogenic capacity in isolated periportal and perivenous rat hepatocytes*. Am J Physiol 2001, 280:E695-E702.

Blake AD, Strader CD. *Potentiation of specific association of insulin with HepG2 cells by phorbol esters*. Biochem J 1986, 236:227-234.

Blakely SR, Hallfrisch J, Reiser S, Prather ES. *Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats*. J Nutr 1981, 111:307-314.

Bloch-Damti A, Potashnik R, Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Rudich A, Bashan N. *Differential effects of IRS1 phosphorylated on Ser307 or Ser632 in the induction of insulin resistance by oxidative stress*. Diabetologia 2006, 49:2463-2473.

Blumenthal SA. *Inhibition of gluconeogenesis in rat liver by lipoic acid. Evidence for more than one site of action*. Biochem J 1984, 219:773-780.

Bollag GE, Roth RA, Beaudoin J, Mochly Rosen D, Koshland DE Jr. *Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity.* Proc Natl Acad Sci USA 1986, 83:5822-5824.

Borcea V, Nourooz-Zadeh J, Wolff SP, Klevesath M, Hofmann M, Urich H, Wahl P, Ziehler R, Wahl P, Tritschler H, Halliwell B, Nawroth PP. *α-Lipoic acid decreases oxidative stress even in diabetic patients with poor glycemic control and albuminuria.* Free Radic Biol Med 1999, 26:1495-1500.

Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Analytical Biochemistry 1976, 72:248:254.

Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. *Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity.* Am J Clin Nutr 2004, 79:537-543.

Bray GA, Popkin BM. *Dietary fat intake does affect obesity!* Am J Clin Nutr 1998, 68:1157-1173.

Brosnan MJ, Chen L, Wheeler CE, Van Dyke A, Koretsky AP. *Phosphocreatine protects ATP from a fructose load in transgenic mouse liver expressing creatine kinase.* Am J Physiol Cell Physiol 1991, 260:C1191-C1200.

Brownlee M. *The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism.* Diabetes 2005, 54:1615-1625.

Burant CF, Saxena M. *Rapid reversible substrate regulation of fructose transporter expression in rat small intestine and kidney.* Am J Physiol 1994, 267:G71–G79.

Busse E, Zimmer G, Schopohl B, Kornhuber B. *Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo.* Arzneimittelforschung 1992, 12:829-831.

Busserolles J, Gueux E, Rock E, Mazur A, Rayssiguier Y. *Substituting honey for refined carbohydrates protects rats from hypertriglyceridemic and prooxidative effects of fructose*. J Nutr 2002, 132:3379-3382.

Busserolles J, Gueux E, Rock E, Demigné C, Mazur A, Rayssiguier Y. *Oligofructose protects against the hypertriglyceridemic and pro-oxidative effects of a high fructose diet in rats*. J Nutr 2003, 133:1903-1908.

Butler A, Hagen TM, Moreau R. *Lipoic acid improves hypertriglyceridemia by stimulating triacylglycerol clearance and downregulating liver triacylglycerol secretion*. Arch Biochem Biophys 2009, 485:63-71.

Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC. *Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid*. Diabetes 2003, 52:2304-2314.

Cahill GF Jr. *Starvation in man*. J Clin Endocrinol Metab 1976, 5:397-415.

Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. *Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappa B*. Nat Med 2005, 11:183-190.

Carmona A, Freedland RA. *Comparison among the lipogenic potential of various substrates in rat hepatocytes: the differential effects of fructose-containing diets on hepatic lipogenesis*. J Nutr 1989, 119:1304-1310.

Castro MC, Massa ML, Del Zotto H, Gagliardino JJ, Francini F. *Rat liver uncoupling protein 2: changes induced by a fructose-rich diet*. Life Sci 2011, 89:609-614.

Catay U, Telci A, Salman S, Satman I, Silvas A. *Oxidative protein damage in type I diabetic patients with and without complications*. Endocr Res 2000, 26:365-379.

Catena C, Giacchetti G, Novello M, Colussi G, Cavarape A, Sechi LA. *Cellular mechanisms of insulin resistance in rats with fructose-induced hypertension*. Am J Hypertens 2003, 16:973-978.

Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T, Welch WJ, Wilcox CS. *Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney*. Hypertension 2002, 39:269-274.

Cherrington AD. *Control of glucose uptake and release by the liver in vivo*. Diabetes 1999, 48:1198-1214.

Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M. STOP-NIDDM Trial Research Group. *Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial*. Lancet 2002, 359:2072-2077.

Chitturi S, Farrell GC. *Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Semin Liver Dis 2001, 21:27-41.

Chomczynsky P, Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem 1987, 162:156-159.

Claiborne. *In CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, Grennwald RA, Ed. Boca Raton, FL, CRC Press 1985, 283-284.

Claus TH, El-Maghrabi MR, Regen DM, Stewart HB, McGrane M, Kountz PD, Nyfeler F, Pilkis J, Pilkis SJ. *The role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism*. Curr Top Cell Regul 1984, 23:57-86.

Clore JN, Post EP, Bailey DJ, Nestler JE, Blackard WG. *Evidence for increased liver glycogen in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus after 3-day fast*. J Clin Endocrinol Metab 1992, 74:660-666.

Commerford SR, Ferniza JB, Bizeau ME, Thresher JS, Willis WT, Pagliassotti MJ. *Diets enriched in sucrose or fat increase gluconeogenesis and*

*G-6-Pase but not basal glucose production in rats.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2002, 283:E545-E555.

Cummings BP, Stanhope KL, Graham JL, Evans JL, Baskin DG, Griffen SC, Havel PJ. *Dietary fructose accelerates the development of diabetes in UCD-T2DM rats: amelioration by the antioxidant,  $\alpha$ -lipoic acid.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2010, 298:R1343-R1350.

Czech MP, Yu KT, Lewis RE, Davis RJ, Mottola C, MacDonald RG, Necessary PC, Corvera S. *Insulin receptor kinase and its mode of signaling membrane components.* Diab Metab Rev 1985, 1:33-58.

Datta K, Sinha S, Chattopadhyay P. *Reactive oxygen species in health and diseases.* Natl Med J India 2000, 13: 304-310.

Davies DR, Dethoux M, van Schaftingen E. *Fructose-1-phosphate and the regulation of glucokinase activity in isolated hepatocytes.* Eur J Biochem 1990, 192:283-289.

DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. *Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview.* Diabetes Care 1992, 15:318-368.

Deiullis JA, Kampfrath T, Ying Z, Maiseyeu A, Rajagopalan S. *Lipoic acid attenuates innate immune infiltration and activation in the visceral adipose tissue of obese insulin resistant mice.* Lipids 2011, 46:1021-1032.

Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. *Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2010, 299:E685-E694.

DeMeyts P. *The diabetogenes concept of NIDDM.* Adv Exp Med Biol 1993, 334:89-100.

Dentin R, Girard J, Postic C. *Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver.* Biochimie 2005, 87:81-86.

Diabetes Prevention Program Research Group. *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin*. The New England Journal of Medicine 2002, 346:393-403.

Dickens M, Chin JE, Roth RA, Ellis L, Denton RM, Tavare JM. *Characterization of insulin-stimulated protein serine/threonine kinases in CHO cells expressing human insulin receptors with point and deletion mutations*. Biochem J 1992, 287:201-209.

Dong X, Park S, Lin X, Copps K, Yi X, White MF. *Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth*. J Clin Invest 2006, 116:101-104.

Encuesta Nacional de Factores de Riesgo, 2009, Ministerio de Salud Pública de la Nación.

Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. *Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome*. Am J Clin Nutr 2002, 76:911-922.

Ellis L, Morgan DO, Clauser E, Roth TA, Rutter WJ. *A membrane-anchored cytoplasmic domain of the human receptor mediates a constitutively elevated insulin-independent uptake of 2-deoxyglucose*. Mol Endocrinol 1987, 1:15-24.

Estrada ED, Ewart SH, Tsakiridis T, Volchuk A, Ramlal T, Tritschler HJ, Klip A. *Stimulation of glucose uptake by the natural coenzyme  $\alpha$ -lipoic acid/thioctic acid: participation of elements of the insulin signaling pathway*. Diabetes 1996, 45:1798-1804.

Evans JL, Goldfine ID.  *$\alpha$ -Lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes*. Diab Technol Therapeut 2000, 2:401-413.

Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. *Oxidative stress and stress-activated signaling pathways a unifying hypothesis of type 2 diabetes*. Endocr Rev 2002, 23:599-622.

Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. *Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?* Diabetes 2003, 52:1-8.

Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. *The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance.* Antioxid Redox Signal 2005, 7:1040-1052.

Evans JL, Youngren JF, Goldfine ID. *Effective treatments for insulin resistance: trim the fat and douse the fire.* Trends Endocrinol Metab 2004, 15:425-431.

Exton JH. *Signaling through phosphatidylcholine breakdown.* J Biol Chem 1990, 265:1-4.

Faeh D, Minehira K, Schwarz J-M, Periasami R, Seongsu P, Tappy L. *Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men.* Diabetes 2005, 54:1907-1913.

Fall CH. *Non-industrialised countries and affluence.* Br Med Bull 2001, 60:33-50.

Farrell GC, Teoh NC, McCuskey RS. *Hepatic microcirculation in fatty liver disease.* Anat Rec (Hoboken) 2008, 291:684-692.

Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Cristol JP, Coudray C. *Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems.* Free Radic Biol Med 2009, 46:624-632.

Ferre T, Riu E, Franckhauser S, Agudo J, Bosch F. *Long-term overexpression of glucokinase in the liver of transgenic mice leads to insulin resistance.* Diabetologia 2003, 46:1662-1668.

Fingar DC, Hausdorff SF, Blenis J, Birnbaum MJ. *Dissociation of pp70 ribosomal protein S6 kinase from insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes.* J Biol Chem 1993, 268:3005-3008.

Fisher SJ, Kahn CR. *Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production.* J Clin Invest 2003, 111:463-468.

Folli F, Saad MJA, Backer JM, Kahn CR. *Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with IRS-1 in liver and muscle of the intact rat.* J Biol Chem 1992, 267:22171-22177.

Ford I, Cotter MA, Cameron NE, Greaves M. *The effects of treatment with  $\alpha$ -lipoic acid or evening primrose oil on vascular hemostatic and lipid risk factors, blood flow, and peripheral nerve conduction in the streptozotocin-diabetic rat.* Metabolism 2001, 50:868-875.

Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. *Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes.* Proc Natl Acad Sci USA 1999, 96: 12737–12742.

Frame S, Cohen P. *GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery.* Biochem J 2001, 359:1-16.

Francini F, Castro MC, Gagliardino JJ, Massa ML. *Regulation of liver glucokinase activity in rats with fructose-induced insulin resistance and impaired glucose and lipid metabolism.* Can J Physiol Pharmacol 2009, 87:702-710.

Francini F, Castro C, Schinella G, García ME, Maiztegui B, Raschia MA, Gagliardino JJ, Massa ML. *Changes induced by a FRD on the hepatic metabolism and the antioxidant system.* Life Sciences 2010, 86:965-971.

Freidenberg GR, Reichart D, Olefsky JM, Henry RR. *Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss.* J Clin Invest 1988, 82:1398-1406.

Fridlyand LE, Philipson LH. *Oxidative reactive species in cell injury: Mechanisms in diabetes mellitus and therapeutic approaches.* Ann N Y Acad Sci 2005, 1066:136-151.

Fried SK y Rao SP. *Sugars, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease.* Am J Clin Nutr 2003, 78:873S-880S.



Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. *Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome*. J Clin Invest 2004, 114:1752-1761.

Garcia-Fuentes E, Murri M, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, García-Almeida JM, Moreno-Santos I, Tinahones FJ, Macias-Gonzalez M. *PPARgamma expression after a high-fat meal is associated with plasma superoxide dismutase activity in morbidly obese persons*. Obesity 2010, 18:952-958.

Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, Ye J. *Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex*. J Biol Chem 2002, 277:48115-48121.

Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, Ye J. *Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes*. Mol Endocrinol 2004, 18:2024-2034.

Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, Pogue J, Sheridan P, Dinccag N, Hanefeld M, Hoogwerf B, Laakso M, Mohan V, Shaw J, Zinman B, Holman RR. *Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial*. Lancet 2006, 368:1096-1105.

Girard A, Madani S, El Boustani ES, Belleville J, Prost J. *Changes in lipid metabolism and antioxidant defense status in spontaneously hypertensive rats and Wistar rats fed a diet enriched with fructose and saturated fatty acids*. Nutrition 2005, 21:240-248.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res 2000, 86: 269-274.

Gronskov K, Vissing H, Shymko RM, Tornqvist H, De Meyts P. *Mutation of arginine 86 to proline in the insulin receptor alpha subunits causes lack of transport of the receptor to the plasma membrane, loss of binding affinity, and a*

*constitutively activated tyrosine kinase in transfected cells.* Biochem Biophys Res Commun 1993, 192:905-911.

Gross LS, Li L, Ford ES, Liu S. *Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment.* Am J Clin Nutr 2004, 79:774-779.

Guichard C, Moreau R, Pessayre D, Epperson TK, Krause KH. *NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes?* Biochem Soc Trans 2008, 36:920-929.

Guillet-Deniau I, Mieulet V, Le Lay S, Achouri Y, Carre D, Girard J, Fougere F, Ferre P. *Sterol regulatory element binding protein-1c expression and action in rat muscles: insulin-like effects on the control of glycolytic and lipogenic enzymes and UCP3 gene expression.* Diabetes 2002, 51:1722-1728.

Gum RJ, Gaede LL, Koterski SL, Heindel M, Clampit JE, Zinker BA, Trevillyan JM, Ulrich RG, Jirousek MR, Rondinone CM. *Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice.* Diabetes 2003, 52:21-28.

Haak E, Usadel KH, Kusterer K, Amini P, Frommeyer R, Tritschler HJ, Haak T. *Effects of alpha-lipoic acid on microcirculation in patients with peripheral diabetic neuropathy.* Exp Clin Endocrinol Diabetes 2000, 108:168-174.

Haenen GR, Bast A. *Scavenging of hypochlorous acid by lipoic acid.* Biochem Pharmacol 1991, 42:2244-2246.

Hallfrisch J. *Metabolic effects of dietary fructose.* FASEB 1990, 4:2652-2660.

Han D, Handelman G, Morcocci L, Sen CK, Roy S, Kobuchi H, Tritschler HJ, Flohe L, Packer L. *Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cysteine utilization.* Biofactors 1997, 9:1-18.

Han D, Tritschler HJ, Packer L. *Alpha-lipoic acid increases intracellular glutathione in a human T-lymphocyte Jurkat cell line*. Biochem Biophys Res Commun 1995, 207:258-264.

Hao J, Shen W, Sun L, Long J, Sharman E, Shi X, Liu J. *Mitochondrial dysfunction in the liver of type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats: improvement by a combination of nutrients*. Br J Nutr 2011, 106:648-655.

Haugaard N, Haugaard ES. *Stimulation of glucose utilization by thioctic acid in rat diaphragm incubated in vitro*. Biochim Biophys Acta 1970, 222:583-586.

Harrison EH, McCormick DB. *The metabolism of dl-{1.6-<sup>14</sup>C} lipoic acid in the rat*. Arch Biochem Biophys 1974, 160:514-522.

Heinz F, Lamprecht W, Kirsch J. *Enzymes of fructose metabolism in human liver*. J Clin Invest 1968, 47:1826-1832.

Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl RA, MacHarzina R, Bräsen JH, Meinertz T, Münzel T. *Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C*. Kidney Int 1999, 55:252-260.

Henriksen EJ. *Exercise training and the antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes*. Free Radic Biol Med 2006, 40:3-12.

Herbert V, Lau KS, Gottlieb CW, Bleicher SJ. *Coated charcoal immunoassay of insulin*. J Clin Endocr Metab 1965, 25:1375-1384.

Himsworth H, Kerr RB. *Insulin-sensitive and insulin-insensitive types of diabetes mellitus*. Clin Sci 1942, 4:120-?.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. *A central role for JNK in obesity and insulin resistance*. Nature 2002, 420:333-336.

Horton TJ, Gayles EC, Prach PA, Koppenhafer TA, Pagliassotti MJ. *Female rats do not develop sucrose-induced insulin resistance*. Am J Physiol 1997, 272:R1571-R1576.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. J Clin Invest 2002, 109:1125-1131.

Hotamisligil GS. *In Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. DTS. Le Roith and JM Olefsky eds. Williams and Wilkins NY 2004, 953-962.

Hotamisligil GS. *Inflammation and metabolic disorders*. Nature 2006, 444:860-867.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. *IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha and obesity-induced insulin resistance*. Science 1996, 271:665-668.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science 1993, 259:87-91.

Hribal ML, Perego L, Lovari S, Andreozzi F, Menghini R, Perego C, Finzi G, Usellini L, Placidi C, Capella C, Guzzi V, Lauro D, Bertuzzi F, Davalli A, Pozza G, Pontiroli A, Federici M, Lauro R, Brunetti A, Folli F, Sesti G. *Chronic hyperglycemia impairs insulin secretion by affecting insulin receptor expression, splicing, and signaling in RIN  $\beta$  cell line and human islets of Langerhans*. FASEB J 2003, 17:1340–1342.

Huang D, Dhawan T, Young S, Yong W, Boros L, Heaney A. *Fructose impairs glucose-induced hepatic triglyceride synthesis*. Lipids Health Dis 2011: 10-20.

Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Shoelson SE, Shulman GI. *Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes*. J Clin Invest 2002, 109:1321-1326.

Huong DT, Ide T. *Dietary lipoic acid-dependent changes in the activity and mRNA levels of hepatic lipogenic enzymes in rats*. Br J Nutr 2008, 100:79-87.

Huuponen R, Karvonen I, Sotaniemi E. *Activity of hepatic glucose phosphorylating and NADPH generating enzymes in Zucker rat*. Diabetes Res 1989, 10:143-146.

Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. *Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis*. Proc Natl Acad Sci USA 2004, 101:7281-7286.

Inoue I, Goto S, Matsunaga T, Nakajima T, Awata T, Hokari S, Komoda T, Katayama S. *The ligands/activators for peroxisome proliferators-activated receptor alpha (PPARalpha) and PPARgamma increase Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells*. Metabolism 2001, 50: 3-11.

Ishimoto T, Lanaspa MA, Le MT, Garcia GE, Diggle CP, Maclean PS, Jackman MR, Asipu A, Roncal-Jimenez CA, Kosugi T, Rivard CJ, Maruyama S, Rodriguez-Iturbe B, Sánchez-Lozada LG, Bonthron DT, Sautin YY, Johnson RJ. *Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A 2012, 109:4320-4325.

Iynedjian PB. *Mammalian glucokinase and its gene*. Biochem J 1993, 293:1-13.

Iynedjian PB. *Molecular physiology of mammalian glucokinase*. Cell Mol Life Sci 2009, 66:27-42.

Jacob S, Henriksen EJ, Schiemann AL, Simon I, Clancy DE, Tritschler HJ, Jung WI, Augustin HJ, Dietze GJ. *Enhancement of glucose disposal in patients with type 2 diabetes by alpha-lipoic acid*. Drug Res 1995, 45:872-874.

Jacob S, Ruus P, Hermann R, Tritschler HJ, Maerker E, Renn W Augustin HJ, Dietze GJ, Rett K. *Oral administration of RAC-alpha-lipoic acid modulates*

*insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial.* Free Radic Biol Med 1999, 27:309-314.

Jacob RJ, Sherwin RS, Greenawalt K, Shulman GI. *Simultaneous insulinlike growth factor I and insulin resistance in obese Zucker rats.* Diabetes 1992, 41:691-697.

Jacob S, Streeper RS, Fogt DL, Hokama JY, Tritschler HJ, Dietze GJ, Henriksen EJ. *The antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid enhances insulin-stimulated glucose metabolism in insulin-resistant rat skeletal muscle.* Diabetes 1996, 45:1024-1029.

Jager J, Gremeaux T, Cormont M, Marchand-Brustel Y, Tanti JF. *Interleukin-1 $\beta$ -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression.* Endocrinology 2007, 148:241-251.

Janevski M, Ratnayake S, Siljanovski S, McGlynn MA, Cameron-Smith D, Lewandowski P. *Fructose containing sugars modulate mRNA of lipogenic genes ACC and FAS and protein levels of transcription factors ChREBP and SREBP1c with no effect on body weight or liver fat.* Food Funct 2012, 3:141-149.

Jocelyn PC. *The standard redox potential of cysteine-cysteine from the thiol-disulphide exchange reaction with glutathione and lipoic acid.* Eur J Biochem 1967, 2:327-331.

Joseph JW, Koshkin V, Zhang CY, Wang J, Lowell BB, Chan CB. *Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet.* Diabetes 2002, 51:3211-3219.

Kahn CR. *Insulin resistance, insulin insensitivity, and unresponsiveness: a necessary distinction.* Metabolism 1978, 27:1893-1902.

Kahn CR. *Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes.* Diabetes 1994, 43:1066-1084.

Kahn CR. *The Gordon Wilson Lecture. Lessons about the control of glucose homeostasis and the pathogenesis of diabetes from knockout mice.* Trans Am Clin Climatol Assoc 2003, 114:125-148.

Kanai F, Ito K, Todaka M, Hayashi H, Kamohara S, Ishii K, Okada T, Hazeki O, Ui M, Ebina Y. *Insulin-stimulated GLUT4 translocation is relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI3-kinase.* Biochem Biophys Res Commun 1993, 195:762-768.

Kanuri G, Spruss A, Wagnerberger S, Bischoff SC, Bergheim I. *Role of tumor necrosis factor alfa (TNF alfa) in the onset of fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice.* J Nutr Biochem 2011a, 22:527-534.

Kanuri G, Spruss A, Wagnerberger S, Bischoff SC, Bergheim I. *Fructose-induced steatosis in mice: role of plasminogen activator inhibitor-1, microsomal triglyceride transfer protein and NKT cells.* Lab Invest 2011b, 91:885-895.

Katsurada A, Iritani N, Fukuda H, Matsumura Y, Nishimoto N, Noguchi T, Tanaka T. *Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of fatty acid synthase in rat liver.* Eur J Biochem 1990, 190:427-433.

Kazumi T, Odaka H, Hozumi T, Ishida Y, Amano N, Yoshino G. *Effects of dietary fructose or glucose on triglycerides production and lipogenic enzyme activities in the liver of Wistar fatty rats, an animal model of NIDDM.* Endocr J 1997, 44:239-245.

Kazumi T, Vranic M, Steiner G. *Triglyceride kinetics: effects of dietary glucose, sucrose, or fructose alone or with hyperinsulinemia.* Am J Physiol 1986, 250:E325:E330.

Kelley GL, Allan G, Azhar S. *High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation.* Endocrinology 2004, 145:548-555.

Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting*. J Clin Invest 1999, 103:1489-1498.

Khan A, Östenson CG, Efendic S. En “*Frontiers of insulin secretion and pancreatic b-cell research*”. Ed Flatt P y Lenzen S. 1994, 103-111.

Khanna S, Atalay M, Laaksonen DE, Gul M, Roy S, Packer L, Hanninen O, Sen CK. *Tissue glutathione homeostasis in response to lipoate supplementation and exercise*. Oxygen Club of California, Annual Meeting 1997.

Khanna S, Atalay M, Laaksonen DE, Gul M, Roy S, Sen CK.  *$\alpha$ -Lipoic acid supplementation: tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise*. J Appl Physiol 1999, 86:1191-1196.

Kim H, Kadowaki H, Sakura H, Odawara M, Momomura K, Takahashi Y, Miyazaki Y, Ohtani T, Akanuma Y, Yazaki Y. *Detection of mutations in the insulin receptor gene in patients with insulin resistance by analysis of single-stranded conformational polymorphisms*. Diabetologia 1992, 35:261-266.

Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman BM. *Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1*. J Clin Invest 1998, 101:1-9.

Kim MS, Park JY, Namkoong C, Jang PG, Ryu JW, Song HS, Yun JY, Namgoong IS, Ha J, Park IS, Lee IK, Viollet B, Youn JH, Lee HK, Lee KU. *Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase*. Nat Med 2004, 10:727-733.

King H, Aubert RE, Herman WH. *Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections*. Diabetes Care 1998, 21:1414-1431.

Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. *SH2 and SH3 domains: elements that control interaction of cytoplasmic signalling proteins*. Science 1991, 252:668-674.



Kolterman G, Gray RS, Griffin J, Burstein P, Inse J, Scarlett J, Olefsky JM. *Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Invest* 1981, 68:957-969.

Koo HY, Miyashita M, Cho BH, Nakamura MT. *Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus. Biochem Biophys Res Commun* 2009, 390:285-289.

Koo HY, Wallig MA, Chung BH, Nara TY, Cho BHS, Nakamura MT. *Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver. Biochem Biophys Acta* 2008, 1782:341-348.

Korieh A, Crouzoulon G. *Dietary regulation of fructose metabolism in the intestine and in the liver of the rat. Duration of the effects of a high fructose diet after the return to the standard diet. Arch Int Physiol Biochim Biophys* 1991, 99:455-460.

König B, Koch A, Spielmann J, Hilgenfeld C, Hirche F, Stangl GI, Eder K. *Activation of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  reduces triacylglycerol synthesis in rat hepatoma cells by reduction of nuclear SREBP-1. Euro J Pharmacol* 2009, 605:23-30.

König B, Koch A, Spielmann J, Hilgenfeld C, Stangl GI, Eder K. *Activation of PPAR alpha lowers synthesis and concentration of cholesterol by reduction of nuclear SREBP-2. Biochem Pharmacol* 2007, 73:574-585.

Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH. *Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. Diabetes* 1991, 40:1397-1403.

Krieger-Brauer HI, Kather H. *Human fat cells possess a plasma membrane-bound H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. J Clin Invest* 1992, 89:1006-1013.

Latin American Diabetes Association. Guías ALAD de diagnóstico control y tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2. Rev Asoc Latinoam de Diabetes 2006, 14: 3-4.

Lavan BE, Huhne MR, Garner CW, Anderson D, Reedijk M, Pawson T, Leinhard GE. *The association with insulin-elicited phosphotyrosine proteins with src homology 2 domains.* J Biol Chem 1992, 267:11631-11636.

Le Ka, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C, Boesch C, Tappy L. *Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes.* Am J Clin Nutr 2009, 89:1760-1765.

Leahy J, Bonner-Weir S, Weir G.  *$\beta$ -Cell dysfunction induced by chronic hyperglycemia: current ideas on mechanism of impaired glucose-induced insulin secretion.* Diabetes Care 1992, 15:442-455.

Lee GY, Kim NH, Zhao ZS, Cha BS, Kim YS. *Peroxisomal-proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the rat hepatic malonyl-CoA decarboxylase gene: a key regulation of malonyl-CoA level.* Biochem J 2004, 378:983-990.

Lee Y, Naseem RH, Park BH, Garry DJ, Richardson JA, Schaffer JE, Unger RH.  *$\alpha$ -Lipoic acids prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA-synthase transgenic mice.* Biochem Biophys Res Commun 2006a, 344:446-452.

Lee CH, Olson P, Hevener P, Mehl I, Chong LW, Olefsky JM, Gonzalez FJ, Ham J, Kang H, Peters JM, Evans RM. *PPAR $\delta$  regulates glucose metabolism and insulin sensitivity.* Proc Natl Acad Sci USA 2006b, 103:3444-3449.

Lee WJ, Song KH, Koh EH, Won JC, Kim HS, Park HS, Kim MS, Kim SW, Lee KU, Park JY. *Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle.* Biochem Biophys Res Commun 2005, 332:885-891.

Leipnitz G, Seminotti B, Fernandes CG, Amaral AU, Beskow AP, da Silva LdeB, Zanatta A, Ribeiro CAJ, Vargas CR, Wajner M. *Striatum is more*

vulnerable to oxidative damage induced by the metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency as compared to liver. *Int J Develop Neurosc* 2009, 27: 351-356.

LeMarchand-Brustel Y, Gremeaux T, Balloti R, Van Obberghen E. *Insulin receptor tyrosine kinase is defective in skeletal muscle of insulin-resistant obese mice*. *Nature* 1985, 315:676-678.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins*. *Methods Enzymol* 1990, 186:464-478.

Lewis RE, Wu GP, MacDonald RG, Czech MP. *Insulin-sensitive phosphorylation of serine 1293/1294 on the human insulin receptor by a tightly associated serine kinase*. *J Biol Chem* 1990, 265:947-954.

Li L, Smith A, Hagen TM, Frei B. *Vascular oxidative stress and inflammation increase with age: ameliorating effects of alpha-lipoic acid supplementation*. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1203:151-159.

Lin Y, Berg AH, Iyengar P, Lam TK, Giacca A, Combs TP, Rajala MW, Du X, Rollman B, Li W, Hawkins M, Barzilai N, Rhodes CJ, Fantus IG, Brownlee M, Scherer PE. *The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species*. *J Biol Chem* 2005, 280:4617-4626.

Liu X, Luo D, Zheng M, Hao Y, Hou L, Zhang S. *Effect of pioglitazone on insulin resistance in fructose-drinking rats correlates with AGEs/RAGE inhibition and block NADPH oxidase and NF kappa B activation*. *Eur J Pharmacol* 2010, 629: 153-158.

Lonardo A, Lombardini S, Ricchi M, Scaglioni F, Loria P. *Review article: hepatic steatosis and insulin resistance*. *Aliment Pharmacol Ther* 2005, 22(suppl 2):64-70.

Lord JM, Atkins TW. *Effect of age on hepatocyte and soleus muscle insulin receptor binding in lean and genetically obese diabetic (ob/ob) mice.* Diabetes Res 1985, 2:259-265.

Louhelainen M, Merasto S, Finckenberg P, Lapatto R, Cheng ZJ, Mervaala EM. *Lipoic acid supplementation prevents cyclosporine-induced hypertension and nephrotoxicity in spontaneously hypertensive rats.* J Hypertens 2006, 24:947-956.

Lu LS, Wu CC, Hung LM, Chiang MT, Lin CT, Lin CW, Lin CW, Su MJ. *Apocynin alleviated hepatic oxidative burden and reduced liver injury in hypercholesterolaemia.* Liver Int 2007, 27:529-537.

Luz J, Zemdegs JCS, Amaral LSG. *Chronic lipoic acid treatment worsens energy imbalances in streptozotocin-induced diabetic rats.* Diabetes & Metab 2009, 35:137-142.

Ma X, Hua J, Li Z. *Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells.* J Hepatol 2008, 49:821-830.

Macias-Gonzales M, Cardona F, Queipo-Ortuño M, Bernal R, Martin M, Tinahones FJ. *PPARgamma mRNA expression is reduced in peripheral blood mononuclear cells after fat overload in patients with metabolic syndrome.* J Nutr 2008, 138:903-907.

Maegawa H, Shigeta Y, Egawa K, Kobayashi M. *Impaired autophosphorylation of insulin receptors from abdominal skeletal muscles in nonobese subjects with NIDDM.* Diabetes 1991, 40:815-819.

Magnuson MA. *Glucokinase gene structure: functional implications of molecular genetic studies.* Diabetes 1990, 39:523-527.

Maitra I, Serbinova E, Trischler H, Packer L.  *$\alpha$ -Lipoic acid prevents buthionine sulfoximine-induced cataract formation in newborn rats.* Free Radic Biol Med 1995, 18:823-829.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. *Effects of  $\alpha$ -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats.* J Nutr Biochem 2003a, 14: 288-294.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. *Oxidative stress and diabetic complications: a review.* J Biochem Mol Tox 2003b, 17: 24-38.

Massa L, Baltrusch S, Okar DA, Lange AJ, Lenzen S, Tiedge M. *Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucose phosphorylation and glucose metabolism in insulin-producing cells.* Diabetes 2004, 53:1020-1029.

Matschinsky FM. *Banting Lecture 1995: A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm.* Diabetes 1996, 45:223-241.

Matsuda M, DeFronzo RA. *Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp.* Diabetes Care 1999, 22:1462-1470.

Matsuki T, Horai R, Sudo K, Iwakura T. *IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions.* J Exp Med 2003, 198:877-888.

Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Tomita S, Sekiya M, Hasty A, Nakagawa Y, Sone H, Toyoshima H, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N. *Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice.* Diabetes 2004, 53:560-569.

Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S. *Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity.* Metabolism 2008, 57:1071-1077.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function*

from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985, 28:412-419.

Mayes PA. *Intermediary metabolism of fructose*. *Am J Clin Nutr* 1993, 58(supp):754S-765S.

McDonald RB. *Influence of dietary sucrose on biological aging*. *Am J Clin Nutr* 1995, 62(1 Suppl):284S-292S.

McQuaid TS, Saleh MC, Joseph JW, Gyulkhandanyan A, Manning-Fox JE, MacLellan JD, Wheeler MB, Chan CB. *cAMP-mediated signaling normalizes glucose-stimulated insulin secretion in uncoupling protein-2 overexpressing  $\beta$ -cells*. *J Endocrinol* 2006, 190:669-680.

Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR. *Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice*. *Endocrinology* 2000, 141: 4021-4031.

Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR. *Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction*. *Mol Cell* 2000, 6:87-97.

Midaoui AE, de Champlain J. *Prevention of hypertension, insulin resistance and oxidative stress by  $\alpha$ -lipoic acid*. *Hypertension* 2002, 39:303-307.

Miyazaki M, Dorbzyń A, Man WC, Chu K, Sampath H, Kim HJ, Ntambi JM. *Stearoyl-CoA desaturase I gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic-gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c- dependent and -independent mechanism*. *J Biol Chem* 2004, 279:25164-25171.

Moini H, Tirosh O, Park YC, Cho KJ, Packer L. *R- $\alpha$ -lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes*. *Arch Biochem Biophys* 2002, 397:384-391.

Morcos M, Borcea V, Isermann B, Gehrke S, Ehret T, Henkels M, Schiekofer S, Hofmann M, Amiral J, Tritschler H, Ziehler R, Wahl P, Nawroth PP. *Effect of  $\alpha$ -lipoic acid on the progression of endothelial cell damage and albuminuria in patients with diabetes mellitus: an exploratory study.* Diab Res Clin Pract 2001, 52:175-183.

Morikawa T, Yasuno R, Wada H. *Do mammalian cells synthesize lipoic acid? Identification of a mouse cDNA encoding a lipoic acid synthase located in mitochondria.* FEBS 2001, 498:16-21.

Mosthaf L, Vogt B, Häring HU, Ullrich A. *Altered expression of insulin receptor types A and B in the skeletal muscle of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients.* Proc Natl Acad Sci U S A 1991, 88:4728-4730.

Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z. *Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR.* Biotechniques 2002, 32:1372:1379.

Myers Jr MG, White MF. *The new elements of insulin signalling: insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains.* Diabetes 1993, 42:643-650.

Naderali EK, Fatani S, Williams G. *Fenofibrate lowers adiposity and corrects metabolic abnormalities, but only partially restores endothelial function in dietary obese rats.* Atherosclerosis 2004, 177:307-312.

Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Mawgawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A. *Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR- $\alpha$ .* Am J Physiol Endocrinol Metab 2002, 282:E1180-E1190.

Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM, Johnson RJ. *A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome.* Am J Physiol Renal Physiol 2006, 290:F625-631.

Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Hatazaki M, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Kajimoto Y, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Hori M. *Modulation of the JNK*

*pathway in liver affects insulin resistance status.* J Biol Chem 2004, 279:45803-45809.

Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, Ezaki O. *Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes.* J Biol Chem 2002, 277:9562-9569.

Nandhini AT, Balakrishnan SD, Anuradha CV. *Response of liver antioxidant system to taurine in rats fed high-fructose diet.* Ind J Exp Biol 2002, 40:1016-1019.

Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato ELO, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R. *Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity.* J Physiol 2007, 583.1:9-24.

Noguchi T, Inoue H, Tanaka T. *Regulation of rat liver L-type pyruvate kinase mRNA by insulin and by fructose.* Eur J Biochem 1982, 128:583-588.

Nordberg J, Arner ES. *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.* Free Radic Biol Med 2001, 31:1287-1312.

Oberley LW, Spitz DR. *Methods Enzymol* 1984, 105:457-464.

Obrosova I, Cao X, Greene DA, Stevens MJ. *Diabetes-induced changes in lens antioxidant status, glucose utilization and energy metabolism: effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid.* Diabetologia 1998, 41:1442-1450.

Obrosova I, Fathallah L, Greene DA. *Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid.* Eur J Pharmacol 2000, 398:139-146.

Oda A, Bannai C, Yamoka T, Kotari T, Matsushima T, Tamashita K. *Inactivation of Cu, Zn-superoxide dismutase by in vitro glycosylation in erythrocytes of diabetic patients.* Horm Metab Res 1994, 26:1-4.



Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M, Taylor R. *Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM*. Diabetes 1996, 45:881-885.

Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M. *Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes*. J Biochem 1994, 269:3568-3573.

Okar DA, Manzano A, Navarro-Sabate A, Riera L, Bartrons R, Lange AJ. *PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate*. Trends Biochem Sci 2001, 26:30-35.

Olefsky JM. *Insulin resistance and insulin action: an in vitro and in vivo perspective*. Diabetes 1981, 30:148-161.

O'Rahilly S, Choi WH, Patel P, Turner RC, Flier JS, Moller DE. *Detection of mutations in insulin-receptor gene in NIDDM patients by analysis of single-stranded conformation polymorphisms*. Diabetes 1991, 40:777-782.

Orci L, Unger R, Ravazzola M, Ogawa A, Komiya I, Baetens D, Lodish HF, Thorens B. *Reduced beta-cell glucose transporter in new-onset diabetic BB rats*. J Clin Invest 1990, 86:1615-1622.

Osmundsen H, Bremer J, Pedersen JJ. *Metabolic aspects of peroxisomal beta-oxidation*. Biochim Biophys Acta 1991, 1085:141-158.

Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Mae Diehl A, Johnson RJ, Abdelmalek MF. *Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease*. J Hepatol 2008, 48:993-999.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science 2004, 306:457-461.

Packer L, Kraemer K, Rimbach G. *Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications*. Nutrition 2001, 17:888-895.

Packer L, Witt E, Tristschler H. *Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant*. Free Radic Biol Med 1995, 19:227-250.

Padmalayam I, Hasham S, Saxena U, Pillariseti S. *Lipoic acid synthase (LASY) A novel role in inflammation, mitochondrial function, and insulin resistance*. Diabetes 2009, 58:600-608.

Pagliassotti M, Horton T. *Sucrose, insulin action and biologic complexity*. Recent Research Developments in Physiology 2004, 2:337-353.

Pagliassotti MJ, Kang J, Thresher JS, Sung CK, Bizeau ME. *Elevated basal PI 3-kinase activity and reduced insulin signaling in sucrose-induced hepatic insulin resistance*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2002, 282:E170-E176.

Pagliassotti MJ, Prach PA. *Quantity of sucrose alters the tissue pattern and time course of insulin resistance in young rats*. Am J Physiol 1995, 269:R641-R646.

Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA, Pan DA. *Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 1996, 271: R1319-R1326.

Pagliassotti MJ, Shahrokhi KA, Moscarello M. *Involvement of liver and skeletal muscle in sucrose-induced insulin resistance: dose-response studies*. Am J Physiol 1994, 266:R1637-R1644.

Paquot N, Castillo MJ, Lefebvre PJ, Scheen AJ. *No increased insulin sensitivity after a single intravenous administration of a recombinant human tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein in obese insulin –resistant patients*. J Clin Endocrinol Metab 2000, 85:1316-1319.

Park OJ, Cesar D, Faix D, Wu K, Shackleton CHL, Hellerstein MK. *Mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. Activation of hepatic pyruvate dehydrogenase through inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase*. Biochem J 1992, 282:753-757.

Parks EJ, Hellerstein MK. *Carbohydrate-induced hypertriacylglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanisms*. Am J Clin Nutr 2000, 71:412-433.

Patsouris D, Reddy JK, Müller M, Kersten S. *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression*. Endocrinology 2006, 147:1508-1516.

Payne VA, Arden C, Wu C, Lange AJ, Agius L. *Dual role of phosphofructokinase-2/fructose biphosphatase-2 in regulating the compartmentation and expression of glucokinase in hepatocytes*. Diabetes 2005, 54:1949-1956.

Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. *A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem 1997, 272:29911-29918.

Pilkis SJ, Claus TH, Kurland IJ, Lange AJ. *6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme*. Annu Rev Biochem 1995, 64:799-835.

Pompella A, Maellaro E, Casini AF, Ferrali M, Ciccoli L, Comporti M. *Measurement of lipid peroxidation in vivo: A comparison of different procedures*. Lipids 1987, 22: 206-211.

Porte D Jr.  *$\beta$ -cells in type II diabetes mellitus*. Diabetes 1991, 40:166-180.

Quaschnig T, Schoming M, Keller M, Thiery J, Nauck M, Chollmeyer P, Wanner C, Krämer-Guth A. *Non-insulin dependent diabetes mellitus and hypertriglyceridemia impair lipoprotein metabolism in chronic hemodialysis patients*. J Am Soc Nephrol 1999, 10:332-341.

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

Rebolledo OR, Marra CA, Raschia A, Rodriguez S, Gagliardino JJ. *Abdominal adipose tissue: early metabolic dysfunction associated to insulin resistance and oxidative stress induced by an unbalanced diet.* Horm Metab Res 2008, 40:794-800.

Reed LJ. *From lipoic acid to multi-enzyme complexes.* Protein Sci 1998, 7:220-224.

Roberts CK, Barnard J, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND. *Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome.* Metabolism 2006, 55:928-934.

Robertson RP, Harmon J, Tran POT, Poitout V. *B-cells glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes.* Diabetes 2004, 53(suppl 1):S119-S124.

Roncal-Jimenez CA, Lanaspá MA, Rivard CJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Jalal D, Andres-Hernando A, Tanabe K, Madero M, Li N, Cicerchi C, Mc Fann K, Sautin YY, Johnson RJ. *Sucrose induces fatty liver and pancreatic inflammation in male breeder rats independent of excess energy intake.* Metabolism. 2011, 60:1259-1270.

Rosen OM. *After insulin binds.* Science 1987, 237:1452-1458.

Ruhnau KJ, Meissner HP, Finn JR, Reljanovic M, Lobisch M, Schutte K, Nehrdich D, Tritschler HJ, Mehnert h, Ziegler D. *Effects of 3 –week oral treatment with the antioxidant thioctic acid (alpha-lipoic acid) in symptomatic diabetic polyneuropathy.* Diabet Med 1999, 16:1040-1043.

Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H, Bashan N. *Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT 4 translocation in 3T3-L1 adipocytes.* Diabetes 1998, 47:1562-1569.

Saad MJA, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg OL, White MF, Kahn CR. *Regulation of insulin receptor substrate I in liver and muscle of animal models of insulin resistance.* J Clin Invest 1992, 90:1839-1849.

Saengsirisuwan V, Perez FR, Sloniger JA, Maier T, Henriksen EJ. *Interactions of exercise training and  $\alpha$ -lipoic acid on insulin signaling in skeletal muscle of obese Zucker rats.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2004, 287:E529-E536.

Samuel VT. *Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to induced insulin resistance.* Trends Endocr Metab 2011, 22:60-6.

Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. *Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities.* Gastroenterology 2001, 120:1183-1192.

Schlessinger J. *How receptor tyrosine kinases activate Ras.* Trends Biochem Sci 1993, 18:273-275.

Schwartz DM, Wolins NE. *A simple and rapid method to assay triacylglycerol in cells and tissues.* J Lipid Res 2007, 48:2514-2520.

Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van der Vliet A, Cross CE, Tritschler H, Halliwell B. *Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation.* Free Radic Res Commun 1994, 20:119-133.

Sedlak J y Lindsay RH. *Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent.* Anal Biochem 1968, 25:192-205.

Sestoft L. *Regulation of fructose metabolism in the perfused rat liver: interrelation with inorganic phosphate, glucose, ketone body and ethanol metabolism.* Biochem Biophys Acta 1974, 343:1-16.

Sewter C, Berger D, Considine RV, Medina G, Rochford J, Ciaraldi T, Henry R, Dohm L, Flier JS, O'Rahilly S, Vidal-Puig AJ. *Human obesity and type 2 diabetes are associated with alteration in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor- $\alpha$ .* Diabetes 2002, 51:1035-1041.

Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. *Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential*. Biochim Biophys Acta 2009, 1790:1149-1160.

Shen W, Liu K, Tian C, Yang L, Li X, Ren J, Packer L, Head E, Sharman E, Liu J. *Protective effects of R-alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine in MIN6 and isolated rat islet cells chronically exposed to oleic acid*. J Cell Biochem 2008, 104:1232-1243.

Shiota M, Galasseti P, Monohan P, Neal D, Cherrington AD. *Small amounts of fructose markedly augment net hepatic glucose uptake in the conscious dog*. Diabetes 1998, 47:867-873.

Shoelson SE, Lee J, Yuan M. *Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance*. Int J Obes Relat Metab Disord 2003, 27 (Suppl 3):S49-S52.

Shoelson SE, White MF, Kahn CR. *Tryptic activation of the insulin receptor*. J Biol Chem 1988, 263:4852-4860.

Sigel H, Prijs B, McCormick DB, Shih JCH. *Stability of binary and ternary complexes of  $\alpha$ -lipoate and lipoate derivatives with  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , and  $Zn^{2+}$  in solution*. Arch Biochem Biophys 1978, 187:208-214.

Simpson IA, Cushman SW. *Hormonal regulation of mammalian glucose transport*. Ann Rev Biochem 1986, 55:1059-1089.

Singh HPP, Bowman R. *Effect of D,L-alpha lipoic acid on the citrate concentration and phosphofructokinase activity of perfused hearts from normal and diabetic rats*. Biochem Biophys Res Commun 1970, 41:555-561.

Slater TF, Sawyer BC. *The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. General features of the systems used*. Biochem J 1971, 123:805-814.

Smith WE, Langer S, Wu Ch, Baltrusch S, Okar DA. *Molecular coordination of hepatic glucose metabolism by the 6-phosphofructo-2-*

*kinase/fructose-2,6-biphosphatase:glucokinase complex*. Mol Endocrinol 2007, 21:1478-1487.

Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM. *Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress*. Curr Med Chem 2004, 11:1135-1146.

Soll AH, Kahn CR, Neville DM Jr. *Insulin receptor deficiency in genetic and acquired obesity*. J Clin Invest 1975, 56:769-780.

Song KH, Lee WJ, Koh JM, Kim HS, Youn JY, Park HS, Koh EH, Kim MS, Youn JH, Lee KU, Park JY.  *$\alpha$ -Lipoic acid prevents diabetes mellitus in diabetis-prone obese rats*. Biochem Biophys Res Commun 2005, 326:197-202.

Spolarics Z, Meyenhofer M. *Augmented resistance to oxidative stress in fatty rats livers induced by a short-term sucrose rich diet*. Biochim Biophys Acta 2000, 1487: 190-200.

Spruss A, Bergheim I. *Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease*. J Nutr Biochem 2009, 20:657-662.

Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. *Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice*. Hepatology 2009, 50:1094-1104.

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. *Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain*. J Biol Chem 2002, 277:44784-44790.

Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W, McGahan JP, Seibert A, Krauss RM, Chiu S, Schaefer EJ, Ai M, Otokozawa S, Nakajima K, Nakano T, Beyesen C, Hellerstein MK, Berglund L, Havel PJ. *Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans*. J Clin Invest 2009, 119:1322-1334.

Stefanska J, Pawliczak R. *Apocynin: molecular aptitudes*. Mediators Inflamm 2008, 106507.

Suganthi R, Rajamani S, Ravichandran MK, Anuradha CV. *Effect of food seasoning spices mixture on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats*. J Med Food 2007, 10:149-153.

Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG Jr, Miralpeix M, White MF. *Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1*. Mol Cell Biol 1993, 13:7418-7428.

Taberner PV, Connelly DM. *Reduced insulin binding to liver plasma membranes in inherently obese diabetic CBA/Ca mice*. Biochem Pharm 1991; 41:729-733.

Taghibiglou C, Rashid-Kolvear F, Van Iderstine SC, Le-Tien H, Fantus IG, Lewis GF, Adeli K. *Hepatic very low density Lipoprotein-ApoB overproduction is associated with attenuated hepatic insulin signaling and overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in a fructose-fed hamster model of insulin resistance*. J Biol Chem 2002, 277:793-803.

Takayama S, White MF, Kahn CR. *Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity*. J Biol Chem 1988, 263:3440-3447.

Tamura S, Fujita-Yamaguchi Y, Larner J. *Insulin-like effect of trypsin on the phosphorylation of rat adipocyte insulin receptor*. J Biol Chem 1983, 258:14749-14752.

Thirunavukkarasu V, Anuradha CV. *Influence of  $\alpha$ -lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant defense system in blood of insulin-resistant rats*. Diabetes Obes Metab 2004, 6:200-207.

Thirunavukkarasu V, Anitha Nandhini AT, Anuradha CV. *Effect of alpha-lipoic acid on lipid profile in rats fed a high-fructose diet*. Exp Diabetes Res 2004, 5:195-200.



Thorburn AW, Storlein LH, Jenkins AB, Khouri S, Kraegen EW. *Fructose induced in vitro insulin resistance and elevated plasma triglycerides levels in rats.* Am J Clin Invest 1989, 49:1155-1163.

Thresher JS, Podolin DA, Wei Y, Mazzeo RS, Pagliassotti MJ. *Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2000, 279:R1334-R1340.

Thuy S, Ladurner R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Königsrainer A, Maier KP, Bischoff SC, Bergheim I. *Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake.* J Nutr 2008, 138:1452-1455.

Tian YF, Hsieh CH, Hsieh YJ, Chen YT, Peng YJ, Hsieh PS.  *$\alpha$ -Lipoic acid prevents mild portal endotoxaemia-induced hepatic inflammation and  $\beta$  cell dysfunction.* Eur J Clin Invest 2012, 42:637-648.

Tiedge M, Lortz Munday R, Lenzen S. *Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species.* Diabetes 1998, 47:1578-1585.

Tilg H, Moschen AR. *Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance.* Mol Med 2008, 14:222-231.

Tomita K, Tamiya G, Ando S, Oshumi K, Chiyo T, Mizutani A, Kitamura N, Toda K, Kaneko T, Horie Y, Han JY, Kato S, Shimoda M, Oike Y, Tomizawa M, Makino S, Ohkura T, Saito H, Kumagai N, Nagata H, Ishii H, Hibi T. *Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice.* Gut 2006, 55:415-424.

Topping DL, Mayes PA. *The concentrations of fructose, glucose and lactate in the splanchnic blood vessels of rats absorbing fructose.* Nutr Metab 1971, 13:331-338.

Trinh KY, O'Doherty RM, Anderson P, Lange AJ, Newgard CB. *Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats.* J Biol Chem 1998, 273:31615-31620.

Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M. Finnish Diabetes Prevention Study Group. *Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance.* The New England Journal of Medicine 2001, 344:1343-1350.

Turner R, Hattersley A, Cook J. *Type II diabetes: search for primary defects.* Ann Med 1992, 24:511-516.

Ueno M, Bezerra RM, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CR, Saad MJ. *A high-fructose diet induces changes in pp185 phosphorylation in muscle and liver of rats.* Braz J Med Biol Res 2000, 33:1421-1427.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. *Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function.* Nature 1997, 389:610-614.

Valdecantos MP, Pérez-Matute P, González-Muniesa P, Prieto-Hontoria PL, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. *Lipoic acid administration prevents nonalcoholic steatosis linked to long-term high-feeding by modulating mitochondrial function.* J Nutr Biochem 2012, en prensa.

Van Schaftingen E, Vandercammen A. *Stimulation of glucose phosphorylation by fructose in isolated hepatocytes.* Eur J Biochem 1989, 179:173-177.

Vaziri ND. *Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic renal disease and hypertension.* Curr Opin Nephrol Hypertens 2004, 1:93-99.

Wei Y, Pagliassotti M. *Hepatospecific effects of fructose on c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase: implications for hepatic insulin resistance.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2004, 287:E926-E933.

Wei Y, Wang D, Pagliassotti M. *Fructose selectively modulates c-jun N-terminal kinase activity and insulin signalling in rat primary hepatocytes*. J Nutr 2005, 135:1642-1646.

Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti M. *Fructose-mediated stress signaling in the liver: implications for hepatic insulin resistance*. J Nutr Biochem 2007, 18:1-9.

Wellen KE, Hotamisligil GS. *Inflammation, stress, and diabetes*. J Clin Invest 2005, 115:1111-1119.

White MF, Kahn CR. *The insulin receptor and tyrosine phosphorylation*. In the enzymes. Boyer PD, Krebs EG. Eds Orlando, FL, Academic 1986:247-302.

Wollin SD, Jones PJ.  *$\alpha$ -Lipoic acid and cardiovascular disease*. J Nutr 2003, 133:3327-3330.

Wu C, Okar DA, Newgard CB, Lange AJ. *Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in mouse liver lowers blood glucose by suppressing hepatic glucose production*. J Clin Invest 2001, 107: 91-98.

Wu C, Okar DA, Stoeckman AK, Peng LJ, Herrera AH, Herrera JE, Towle HC, Lange AJ. *A potential role for fructose-2,6-bisphosphatase in the stimulation of hepatic glucokinase gene expression*. Endocrinology 2004, 145:650-658.

Yagi K. *A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma*. Biochem Med 1976, 15:212-216.

Yan LJ, Traber MG, Kobuchi H, Matsugo S, Tritschler HJ, Packer L. *Efficacy of hypochlorous scavengers in the prevention of protein carbonyl formation*. Arch Biochem Biophys 1996, 327:330-334.

Yi X, Maeda N.  *$\alpha$ -Lipoic acid prevents the increase in atherosclerosis induced by diabetes and apolipoprotein E-deficient mice fed high-fat/low-cholesterol diet*. Diabetes 2006, 55: 2238-2244.

Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. *The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta*. Nature 1998, 396:77-80.

Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. *Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta*. Science 2001, 293:1673-1677.

Zavaroni I, Chen YD, Reaven GM. *Studies of the mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat*. Metabolism 1982, 31:1077-1083.

Ziegler D, Reljanovic M, Mehnert H, Gries FA.  *$\alpha$ -Lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy in Germany: current evidence from clinical trial*. Exper Clin Endocrin Diab 1999, 107:421-430.

Zinker BA, Rondinone CM, Trevillyan JM, Gum RJ, Clampit JE, Waring JF, Xie N, Wilcox D, Jacobson P, Frost L, Kroeger PE, Reilly RM, Koterski S, Opgenorth TJ, Ulrich RG, Crosby S, Butler M, Murray SF, McKay RA, Bhanot S, Monia BP, Jirousek MR. *PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice*. Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99:11357-11362.

Zoccoli MA, Hoopes RR, Karnovsky ML. *Rat liver microsomal glucose-6-P translocase. Effect of physiological status on inhibition and labeling by stilbene disulfonic acid derivatives*. J Biol Chem. 1982, 257:11296-11300.

***PUBLICACIÓN***

---