

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**



**Dieta y Estrés Oxidativo: Cambios Precoces en el  
Metabolismo y la Expresión de Genes en la Patogenia  
de la Diabetes Tipo2**

Trabajo de Tesis para optar al título de  
**DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD**

Tesista: **MARÍA ELISA GARCÍA**

Director: Prof. Dr. OSCAR R. REBOLLEDO

Co-director: Prof. Dr. JUAN JOSÉ GAGLIARDINO

**2013**

*Sea lo que sea que puedas o sueños que puedas, comiéndalo.  
Atrevimiento posee genio, poder y magia. Comiéndalo  
ahora.*

*Goethe*

*A mis padres*

*Quiénes siempre acompañaron el camino de mi vida y me enseñaron que cada tropezón, es un capítulo más y una lección que me ayuda a crecer, aprender y seguir adelante.*

## Agradecimientos

---

Deseo expresar mi agradecimiento al Doctor Juan J. Gagliardino por haberme permitido desarrollar el trabajo de esta Tesis en el Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA), Facultad de Ciencias Médicas de la ciudad de La Plata, por su constante apoyo y estímulo en este arduo camino que es la investigación científica y por su compromiso como co-director de este trabajo.

Mi agradecimiento al Doctor Oscar R. Rebolledo por el compromiso y la responsabilidad con que tomó la dirección de este trabajo.

Agradezco a todos los que colaboraron en la realización de este trabajo de Tesis doctoral y en especial a:

César E. Bianchi, con quién elegí compartir mi vida y es quien siempre estuvo a mi lado y me acompañó para poder cumplir con mi promesa.

Señora Elma E. Pérez de Gagliardino, para mi “Pichi”, por su amistad incondicional, los lindos momentos compartidos con ricos cafecitos y además, por enseñarme a trabajar y desenvolverme en el laboratorio.

Doctores Carlos A. Marra del INIBIOLP, Facultad de Ciencias Médicas (UNLP) y Eduardo Spinedi por su colaboración y orientación en los trabajos realizados conjuntamente.

Licenciado Juan P. Fariña, quién compartió y colaboró con gran parte de este trabajo aprendiendo como becario y comentando largamente los resultados de los numerosos experimentos.

Todos mis compañeros de trabajo con quienes compartí estos años y me brindaron su valioso apoyo y colaboración.

## *Agradecimientos*

---

El presente trabajo fue financiado con subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas): BID - PICT 2007 - 1051; CONICET – PIP 1211.

	<b>Página</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1- 23</b>
I. 1. Estrés oxidativo.....	2
I. 1. 1 Vías de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)....	3
I. 1. 2. Generación mitocondrial de ROS.....	6
I. 1. 3. Generación extra mitocondrial de ROS:	
actividad de la NADPH-oxidasa.....	6
I. 2. Sistema de defensa antioxidante.....	7
I. 3. Tejido adiposo	
I. 3. 1. Morfología.....	11
I. 3. 2. Tejido adiposo como órgano endocrino.....	13
I. 3. 3. Adipoquinas específicas del tejido adiposo	
I. 3. 3. 1. Adiponectina.....	15
I. 3. 3. 2. Resistina.....	17
I. 3. 3. 3. Leptina.....	17
I. 3. 3. 4. Adipsina y proteína estimulante de acetilación (ASP).....	18
I. 3. 4. Adipoquinas no específicas del tejido adiposo	
I. 3. 4. 1. Interleuquina 6 (IL-6).....	19
I. 3. 4. 2. Factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ).....	19
I. 3. 4. 3. Inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1).....	20
I. 4. Insulinorresistencia en el tejido adiposo abdominal.....	20
 <b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	 <b>24 - 25</b>
 <b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	 <b>26- 41</b>
III. 1. Reactivos y drogas empleadas.....	26
III. 2. Animales	
III. 2. 1. Mantenimiento de los animales.....	27
III. 2. 2. Grupos experimentales.....	27
III. 2. 3. Obtención de sangre y plasma.....	28
III. 3. Parámetros séricos	
III. 3. 1. Glucemia.....	29

	<b>Página</b>
III. 3. 2. Insulinemia.....	29
III. 3. 3. Triglicéridos.....	29
III. 3. 4. Fructosamina.....	29
III. 3. 5. Leptina.....	29
III. 3. 6. Adiponectina.....	29
III. 3. 7. Índice de insulinoresistencia (HOMA-IR).....	30
III. 3. 8. Colesterol total (CT) y en fracciones lipoproteicas (C-HDL, C-LDL y C-VLDL).....	30
III. 3. 9. Tolerancia a la glucosa intraperitoneal (TGIP).....	30
III. 4. Procesamiento del tejido adiposo	
III. 4. 1. Obtención de células adiposas (adipocitos).....	31
III. 4. 2. Incubación de adipocitos aislados.....	31
III. 4. 3. Determinación de la composición de ácidos grasos mayoritarios y de triglicéridos.....	32
III. 4. 4. Determinación de sustancias reductoras del ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	32
III. 4. 5. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes y contenido de antioxidantes no enzimáticos.....	33
III. 4. 6. Determinación de la actividad de NADPH-oxidasa.....	33
III. 4. 7. Determinación de la producción <i>in situ</i> de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	34
III. 5. Evaluación del patrón de expresión proteica de enzimas antioxidantes	
III. 5. 1. Western blot.....	34
III. 5. 2. Transferencia.....	35
III. 5. 3. Inmunotinción.....	35
III. 6. Reacción en cadena de polimerasa. Punto final y en tiempo real: identificación y cuantificación de genes de enzimas antioxidantes	
III. 6. 1. Aislamiento de ARN total.....	36
III. 6. 2. Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	37
III. 6. 3. Diseño de cebadores.....	38

	<b>Página</b>
III. 6. 4. Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR)....	39
III. 7. Análisis estadístico de los resultados.....	41
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>42 - 64</b>
IV. 1. Modelo experimental de dismetabolismo y estrés oxidativo inducido por administración de dieta rica en fructosa	
IV. 1. 1. Composición de la dieta, consumo diario de masa y calorías...	42
IV. 1. 2. Efecto de la dieta rica en fructosa sobre el peso corporal.....	43
IV. 2. Marcadores plasmáticos del dismetabolismo inducido por la dieta rica en fructosa.....	44
IV. 3. Perfil lipídico sérico en los distintos grupos.....	45
IV. 3. 1. Composición de ácidos grasos de triglicéridos y fosfolípidos de las fracciones de HDL y VLDL+LDL plasmáticas.....	46
IV. 4. Tejido adiposo abdominal. Marcadores metabólicos y de estrés oxidativo inducidos por la dieta rica en fructosa	
IV. 4. 1. Contenido de TBARS en tejido adiposo abdominal.....	49
IV. 4. 2. Expresión del gen de leptina y de los receptores de insulina 1 y 2.....	49
IV. 4. 3. Determinación de la composición de ácidos grasos mayoritarios de triglicéridos del tejido adiposo abdominal.....	51
IV. 4. 4. Actividad de enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos.....	52
IV. 4. 5. Expresión de enzimas antioxidantes.....	53
IV. 4. 5. 1. Superóxido dismutasa 1 (SOD-1).....	54
IV. 4. 5. 2. Superóxido dismutasa 2 (SOD-2).....	55
IV. 4. 5. 3. Catalasa.....	56
IV. 4. 5. 4. Glutatión reductasa.....	57
IV. 5. Estudios dinámicos <i>in vitro</i> : incubación de tejido adiposo abdominal	
IV. 5. 1. Liberación de ácidos grasos libres (NEFA).....	58



---

	<b>Página</b>
IV. 5. 2. Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en adipocitos aislados de tejido adiposo abdominal	
IV. 5. 2. 1. Producción de ROS (método con diclorofluoresceína)....	60
IV. 5. 2. 2. Producción de formazán como medida de la actividad de NADPH-oxidasa.....	61
IV. 6. Efecto del ácido $\alpha$ -lipoico sobre marcadores plasmáticos del dismetabolismo inducido por la dieta rica en fructosa	
IV. 6. 1. Efecto de la dieta rica en fructosa sobre el peso corporal.....	62
IV. 6. 2. Marcadores plasmáticos del dismetabolismo inducido por la dieta rica en fructosa.....	62
IV. 6. 3. Producción de ROS en adipocitos.....	64
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>65 - 74</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>75 - 76</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>77 - 94</b>
<b>VIII. TRABAJOS PUBLICADOS.....</b>	<b>95</b>
<b>IX. PRESENTACIONES A CONGRESOS.....</b>	<b>96 - 97</b>

- AGL: Ácidos Grasos Libres
- AMPK: AMP-quinasa
- BH4: Tetrahidrobiopterina
- C: Control
- C-AL: Control tratado con ácido  $\alpha$ -lipoico
- C-APO: Control tratado con Apocinina
- CAT: Catalasa
- DCFA: Di-cloro-fluoresceína
- DMT2: Diabetes Mellitus Tipo 2
- DPI: Di-Fenil-Iodonium
- DRF-AL: Tratado con Fructosa + ácido  $\alpha$ -lipoico
- DRF-APO: Tratado con Fructosa + Apocinina
- DRS: Dieta Rica en Fructosa
- EO: Estrés Oxidativo
- GPX: Glutación Peroxidasa
- GR: Glutación Reductasa
- GSH: Glutación Reducido
- GSSG: Glutación Oxidado
- HDL: Lipoproteínas de alta densidad
- 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*)
- LDL: Lipoproteínas de baja densidad
- LPL-1: Lipoproteína lipasa 1
- NADPH-oxidasa: Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido oxidasa
- NEFA: Ácidos Grasos no Esterificados (del inglés *non-esterified fatty acids*)
- NF $\kappa$ B: Factor Nuclear kappa Beta (del inglés *nuclear factor kappa- $\beta$* )
- NO: Óxido Nítrico
- NOS: Óxido Nítrico sintasa

PAI-1: Inhibidor del Activador de Plasminógeno (del inglés *plasminogen activator inhibitor-1*)

PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*)

qPCR: Reacción en Cadena de Polimerasa Cuantitativa (del inglés *quantitative polymerase chain reaction*)

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno (del inglés *reactive oxygen species*)

SM: Síndrome Metabólico

SOD: Superóxido Dismutasa

TA: Tejido Adiposo

TAA: Tejido Adiposo Abdominal

TBARS: Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico

TG: Triglicéridos

TGA: Tolerancia a la Glucosa Alterada

TGIP: Tolerancia a la Glucosa Intra Peritoneal

TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral (del inglés *tumoral necrosis factor  $\alpha$* )

UCP: Proteína Desacoplante (del inglés *uncoupling protein*)

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

XDH: Xantina deshidrogenasa

XO: Xantina-oxidasa

La Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) es una enfermedad crónica grave cuyo aumento creciente se relaciona estrechamente con la adopción de estilos de vida no saludables tales como planes de alimentación inadecuados, sedentarismo y estrés crónico. Diversos estudios han demostrado que el crecimiento de su prevalencia es mayor en países en desarrollo como el nuestro (Fall CH 2001; Ferrante D y Virgolini M 2007; Ferrante D y col. 2011; Mokdad AH y col. 2003; Must A y col. 1999). La DMT2 se asocia frecuentemente con otros factores de riesgo cardiovascular tales como obesidad de tipo central, hipertensión arterial y dislipidemia, constituyendo el Síndrome Metabólico (SM) (Bellomo A y col. 2007). En la última clasificación de la Federación Internacional de Diabetes el componente primordial del SM es el aumento del perímetro de cintura condicionado por el depósito de grasa abdominal. Numerosos estudios han demostrado la importancia de la distribución corporal del tejido adiposo (TA) en el desarrollo de los desórdenes metabólicos tales como la tolerancia a la glucosa alterada (TGA), dislipemia y enfermedad cardiovascular (Bellomo A y col. 2007).

Aunque la aparición de la DMT2 implica una falla de la función de las células  $\beta$  productoras de insulina (Poitout V y Robertson RP, 2002) su patogenia es compleja, por lo que la búsqueda de estrategias de control y tratamiento eficaces requieren de un enfoque múltiple con la inclusión de otros órganos claves para explicar la disfunción metabólica existente. Tal es el caso del tejido adiposo abdominal (TAA). Esta grasa no es tan sólo un depósito de sustratos de alto valor energético, sino también un productor de adipocitoquinas (interleuquinas (IL), leptina, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), resistina, angiotensinógeno, adiponectina, etc), que participan en la regulación de la homeostasis metabólica y energética (Schäffler A y col. 2006). Alteraciones en su masa y función endócrina promueven la ruptura de dicha homeostasis y el desarrollo de insulinoresistencia (IR) (Poitout V & Robinson RP 2002). La IR afecta entre otras a la función hepática, aumentando la liberación inapropiada de glucosa y triglicéridos (TG) (Bezzerra RM y col. 2000; Catena C y col. 2003; Thorburn AW y col. 1989). La asociación de IR, hiperglucemia e hiperlipidemia aumentan la demanda de

insulina con la consiguiente sobrecarga funcional de las células  $\beta$  pancreáticas, favoreciendo el desarrollo de DMT2 en personas genéticamente predispuestas.

Estas alteraciones se acompañan de disfunción endotelial con aumento de la actividad de la NADPH-oxidasa (Carey RM & Siragy EHM 2003) -que aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)- y producción inapropiada de endotelinas, que afectan la contractilidad vascular (Marrachelli VG y col. 2006). Este complejo conjunto de alteraciones endocrino/paracrinas aumenta tanto la producción local (p.ej. en el TAA) de ROS como la sistémica (Hainault I y col. 2002).

Buscando unificar la patogenia de todas estas alteraciones, Brownlee MJ (2003) ha sugerido que ellas se originarían a partir del aumento en la producción de ROS, inducida por un aporte exagerado de sustratos y ulterior alteración de diversas vías metabólicas. Diversos autores postulan que este proceso comenzaría en el tejido adiposo abdominal (TAA) con un aumento de la actividad de su NADPH-oxidasa (Furukawa S y col. 2004) con el subsecuente incremento de la producción de ROS y una deficiencia concomitante de su neutralización por los sistemas antioxidantes que llevarían al establecimiento de una condición de estrés oxidativo.

### I.1 Estrés oxidativo

La evolución de la vida en la tierra dio origen a organismos aeróbicos cuya supervivencia depende de la presencia del oxígeno para realizar sus procesos metabólicos (Touyz RM, 2012) Paradójicamente este oxígeno *vital* para las células puede resultar tóxico por su contribución a la producción de radicales libres. Se denomina radical libre a cualquier especie (átomo, molécula o ión) que contenga al menos un electrón desapareado en su órbita más externa y que sea capaz de existir de forma independiente.

Las ROS, comprenden todas aquellas especies reactivas que siendo o no radicales libres centran su reactividad en un átomo de oxígeno. También a

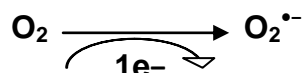
menudo bajo la denominación de ROS se incluyen otras especies químicas no derivadas del oxígeno como nitrógeno, azufre o cloro.

Bajo ciertas condiciones, la velocidad de generación de ROS en el organismo supera a la capacidad del sistema de defensa antioxidante, provocando un desequilibrio redox que se conoce como *estrés oxidativo* (EO) (Dean P & Young-Mi Go 2010). Cuando el EO afecta a sustratos biológicos, el desequilibrio *redox* afecta a macromoléculas lo que produce un daño oxidativo. Según su intensidad y duración los estados patológicos generados afectan a múltiples tejidos del organismo y conducen al deterioro progresivo de funciones vitales, en nuestro caso, la aparición de DMT2. Actualmente disponemos de varios biomarcadores de estrés oxidativo y del daño inducido por él, la mayoría de los cuales posee una potencial utilidad clínica.

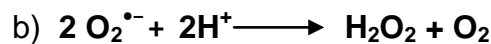
### I. 1. 1. Vías de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

El fenómeno de la toxicidad del oxígeno, referido como la paradoja de la aerobiosis, es inherente a su estructura atómica. El oxígeno molecular es un biradical que genera agua tras la adición secuencial de cuatro electrones y cuatro protones en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. En este proceso, en el que se produce gran cantidad de energía en forma de ATP, pueden también generarse moléculas parcialmente reducidas con uno, dos y tres electrones. Estas moléculas son:

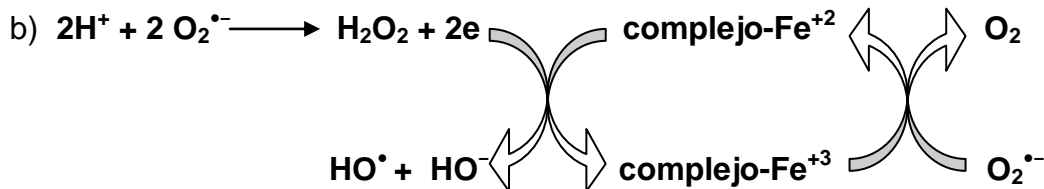
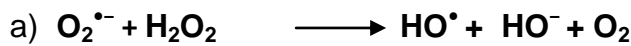
- ✓ **Radical superóxido:** puede formarse por dos vías una enzimática y otra no enzimática. En la vía enzimática, las enzimas que participan son la xantina-oxidasa, la citocromo P-450 y la NADPH-oxidasa



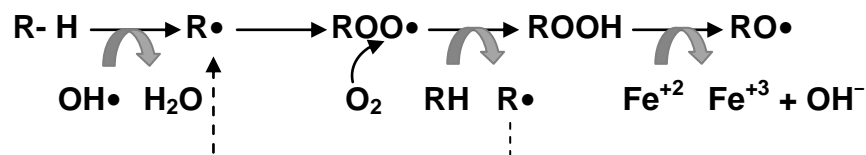
- ✓ **Peróxido de hidrógeno:** puede generarse por reducción enzimática del oxígeno (a) o por dismutación del superóxido ya sea espontáneamente o catalizada por la superóxido dismutasa (SOD) (b)



- ✓ **Radical hidroxilo:** ésta es la especie más oxidante que puede afectar ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, principalmente uniéndose a los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados. Puede formarse mediante dos reacciones, una es la de Haber-Weiss (a) y la otra la de Fenton (b) de mayor relevancia biológica.

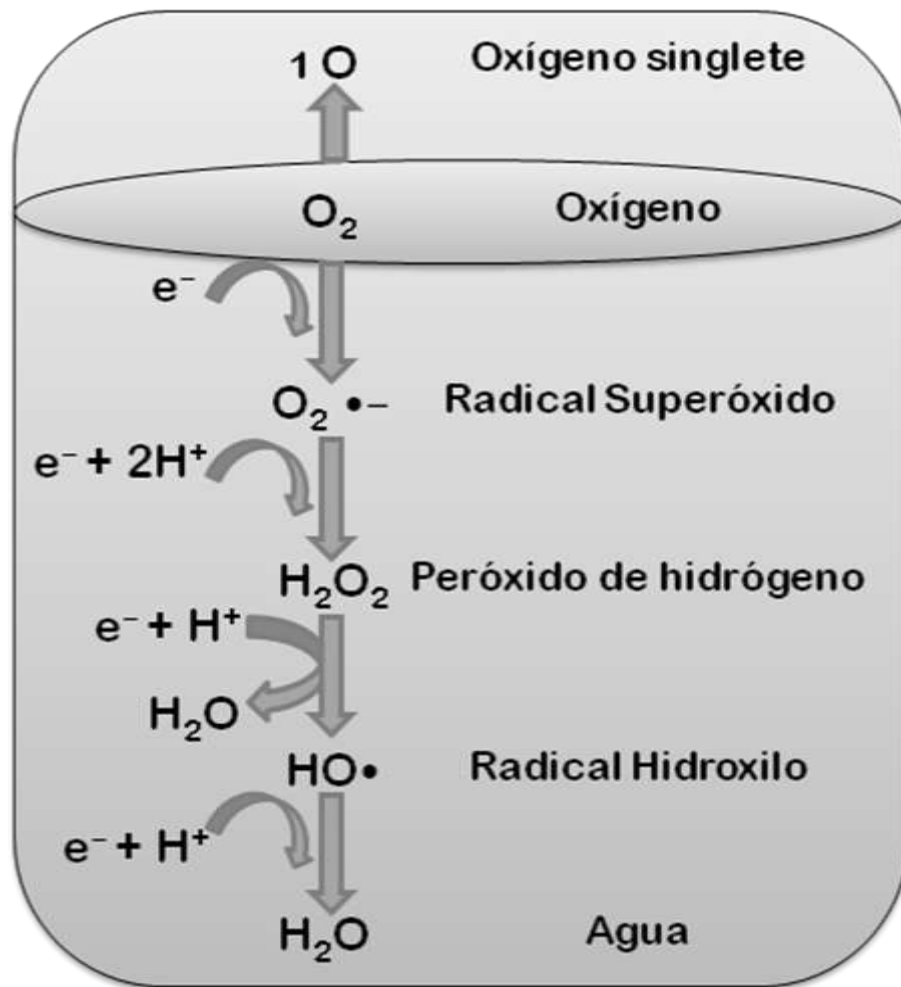


- ✓ **Radicales orgánicos: (R•, RO•, ROO•):** se producen cuando las ROS atacan a moléculas orgánicas, particularmente lípidos insaturados, generando especies reactivas de estas moléculas que a su vez dañan a moléculas vecinas produciendo una reacción en cadena.



Todas estas formas de ROS (Figura 1) causan lesiones oxidativas a las macromoléculas celulares (lípidos, proteínas y ADN). Las lesiones se manifiestan

como peroxidación de los lípidos insaturados de las membranas, modificaciones en el ADN (alteración de bases, roturas de las cadenas, intercambios entre las cromátidas hermanas, etc.), cruzamientos entre las proteínas y el ADN, carbonilación proteica y pérdida de los grupos SH- de las proteínas, etc.



**Figura 1:** esquema general de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).

La producción de ROS está presente en reacciones catalizadas por la xantina-oxidasa (XO), la óxido-nítrico sintasa (NOS), enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial y la fosfato nicotinamida-adenina dinucleótido-oxidasa (NADPH-oxidasa). Tanto la XO como la xantina-deshidrogenasa (XDH) son formas interconvertibles de la misma enzima, que participan en diversas



reacciones biológicas, principalmente en la degradación de purinas oxidando al NADH para formar  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ .

En condiciones fisiológicas, en presencia del cofactor tetrahidrobiopterina (BH4) y del sustrato endógeno L-arginina, la NOS produce óxido nítrico (NO). Sus tres isoformas son capaces de producir  $O_2^{\bullet-}$ .

### I. 1. 2. Generación mitocondrial de ROS

La mitocondria se encuentra particularmente involucrada en el metabolismo de la célula mediante señales de transducción y la regulación de la formación de ROS. Más del 95% del  $O_2$  consumido por la célula es reducido por el complejo IV formando dos moléculas de agua. En condiciones normales, sólo el 1-2% del flujo de electrones convierte el  $O_2$  en  $O_2^{\bullet-}$ .

La producción de ROS en la mitocondria está modulada por varios factores tales como la cadena de transporte de electrones, el contenido de antioxidantes liposolubles ( $\alpha$ -tocoferol o vitamina E,  $\beta$ -carotenoides, licopenos y retinol o vitamina A), hidrosolubles (glutatión reducido o GSH), la concentración de  $O_2$  y NO, la disponibilidad de dadores de electrones y la actividad de la proteína desacoplante UCP (del inglés *uncoupling protein*).

Cuando se producen alteraciones biológicas en la mitocondria, éstas se asocian con disfunción y EO (Ungvary Z y col. en el 2008). En enfermedades cardiovasculares y neurológicas hay una disfunción (aumento o disminución) de la actividad de los complejos I, III y IV de la cadena transportadora de electrones.

### I. 1. 3. Generación extra mitocondrial de ROS: actividad de la NADPH-oxidasa

Hasta no hace mucho tiempo se consideraba a la mitocondria la fuente principal de ROS, sin embargo, ahora hay evidencia suficiente que indica que las NADPH-oxidasas, denominadas NOX, también cumplen un rol muy importante.

La familia NOX comprende siete miembros caracterizados por poseer una subunidad catalítica como sitio activo. Estas incluyen la NOX1, NOX2 (antes gp91 phox), NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2. (Miller AA y col. 2006). La

NADPH-oxidasa se encontró inicialmente en fagocitos y está compuesta por cinco subunidades: p47phox, p67phox, p40phox, p22phox y la subunidad catalítica gp91phox. Esta familia de NOX, se expresa en muchos tejidos y actúan como mediadores de diversas funciones biológicas. Todas son proteínas transmembrana, que transportan electrones para reducir al oxígeno.

La NOX1 se encuentra principalmente en células epiteliales del colon y también en células endoteliales, vasos y músculo liso; participan en mecanismos de defensa y crecimiento celular.

La NOX2 se expresa en fagocitos, vasos, músculo cardíaco, riñón y células neuronales.

La NOX3 se encuentra en tejidos fetales y en oído interno del adulto; participa en regulación de la función vestibular.

La NOX4, también llamada “Renox” (renal oxidasa) por su abundancia a nivel renal, también se encuentra en células vasculares, fibroblastos y osteoclastos. Produce principalmente  $H_2O_2$ , mientras que la NOX1 genera  $O_2^{\bullet-}$  que luego es convertido a  $H_2O_2$ . La diferencia entre los productos generados por NOX1 y 4 sería la de cumplir distintos roles en la señalización intracelular.

La NOX5 que es la única dependiente de la presencia  $Ca^{2+}$ , se encuentra en testículo y tejido linfoide.

Todas las NOX excepto la 5 necesitan la presencia de p22phox (Griendling KK 2006). Su activación involucra la translocación, fosforilación de p47phox y la asociación de esta última con la p67phox y el citocromo b558. El aumento en la expresión de ARNm de NOX se observa en respuesta a estímulos físicos (estrés, presión), factores de crecimiento (factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico), citoquinas ( $TNF\alpha$ , IL-1), factores metabólicos (hiperglucemia, hiperinsulinemia, ácidos grasos libres (AGL)) y receptores agonistas acoplados a proteína G (serotonina, trombina, endotelina).

### I. 2. Sistema de defensa antioxidante

Dada la alta reactividad de los ROS, los seres vivos hemos desarrollado diversos mecanismos eficientes que permiten la estabilización, eliminación y

protección contra sus efectos deletéreos. Entre estos mecanismos se destacan enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD) con dos isoformas, una de ellas se encuentra en el citosol y requiere de cobre y zinc como cofactores para su activación (SOD-1), la otra está presente en las mitocondrias y en este caso el cofactor es el manganeso (SOD-2). La catalasa (CAT) cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua y la glutatión peroxidasa (GPX) que cataliza la oxidación del glutatión en presencia de peróxido de hidrógeno requiriendo el selenio como cofactor (Betteridge D 2000; Romero E y col. 1998). Los resultados experimentales sustentan la hipótesis de una relación directa entre el nivel de esos minerales y la actividad de las enzimas antioxidantes (Podracka L y col. 1999).

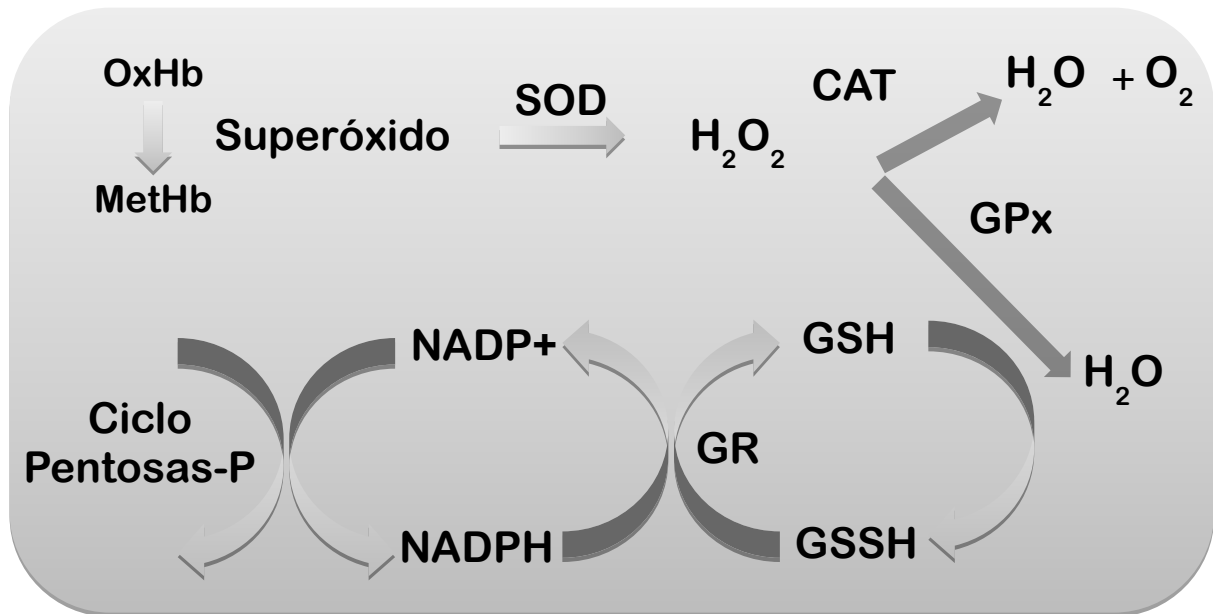
Particularmente la SOD requiere de cobre (Cu) y zinc (Zn) como cofactores, los cuales, además de su capacidad antioxidante, desempeñan otras importantes funciones a nivel celular relacionados con la inmunidad, maduración sexual, expresión de información genética, y producción de energía (Czajka-Narins D 1998).

El sistema no enzimático incluye a los tocoferoles, carotenoides, licopenos retinol, glutatión, bilirrubina y ácido úrico.

En el sistema enzimático, la SOD cataliza la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno.

La GPX reduce el peróxido de hidrógeno y lipoperóxidos a agua y alcoholes, formándose glutatión oxidado (GSSG); éste a su vez puede ser reciclado por la glutatión reductasa (GR) a glutatión reducido (GSH) utilizando NADPH como sustrato.

La CAT está localizada principalmente en los peroxisomas y cataliza la reacción de transformación de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Es muy efectiva en presencia de niveles muy altos de EO y protege a las células del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado intracelularmente. (Figura 2).



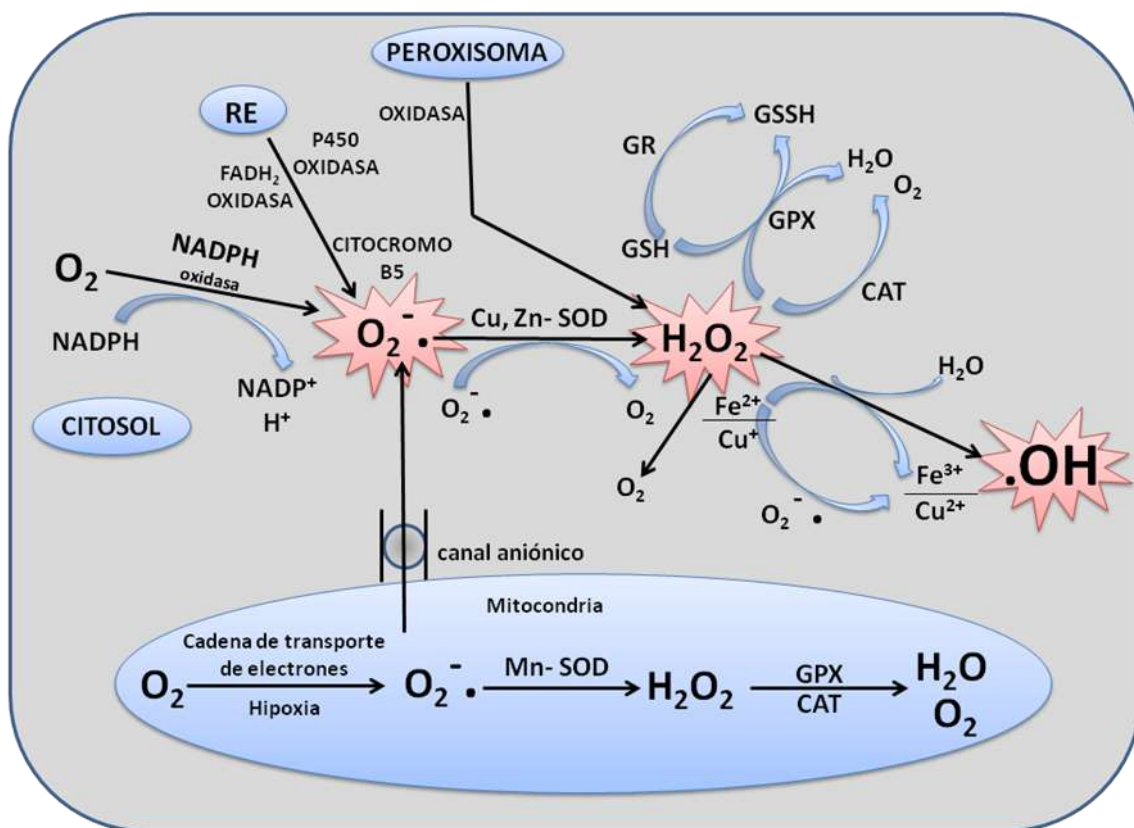
**Figura 2:** Vías de acción del sistema antioxidante celular. OxHb: oxihemoglobina, MetHb: metahemoglobina

Además del sistema enzimático, las células son capaces de defenderse contra los daños de las ROS mediante el uso de antioxidantes celulares como el ácido ascórbico (vitamina C), ácido úrico y GSH. Del mismo modo, los polifenoles colaboran en la prevención de daños causados por las ROS eliminando radicales libres. Por el contrario, la capacidad antioxidante del espacio extracelular es relativamente escasa: el antioxidante plasmático más importante es el ácido úrico.

Los efectos de las ROS sobre el metabolismo celular incluyen no sólo la muerte celular programada y la necrosis, sino también efectos positivos tales como la inducción de genes de defensa y la movilización de los sistemas de transporte de iones. También se los involucra en funciones de señalización *redox* o señalización oxidativa. En particular, las plaquetas que participan en la reparación de heridas y en la hemostasia, liberan ROS que permiten reclutar más plaquetas en los sitios de lesión. Éstas también proporcionan un enlace a la adaptación del sistema inmune a través del reclutamiento de glóbulos blancos.

Las ROS también están implicadas en una gran variedad de respuestas inflamatorias incluyendo las enfermedades cardiovasculares. Asimismo participan en la patogenia del daño coclear inducido por niveles de sonido elevados, toxicidad de drogas como el cisplatino y en la sordera congénita en animales y humanos. La señalización *redox* también participa en el mecanismo de las lesiones isquémicas tales como los accidentes cerebrovasculares y el infarto agudo de miocardio.

En la figura 3 se resumen las interrelaciones entre la producción de las ROS y la acción del sistema de enzimas antioxidantes a nivel mitocondrial y extramitocondrial.

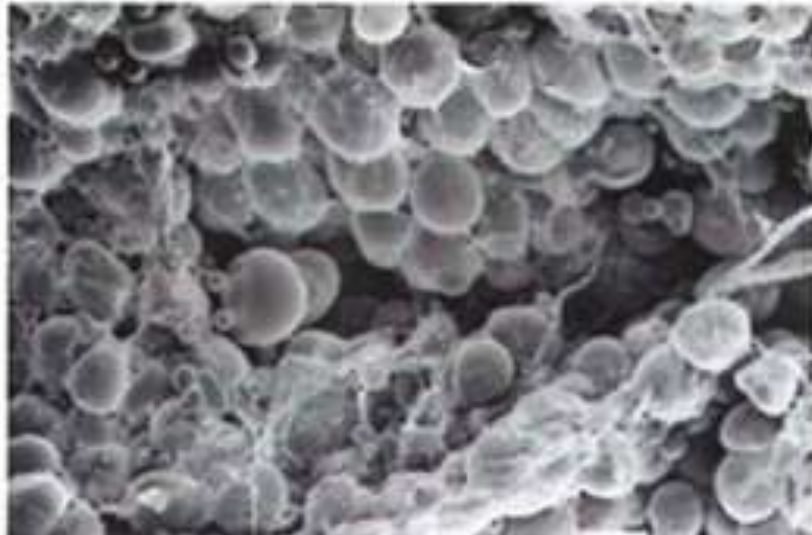


**Figura 3:** Mecanismos de producción de ROS en el citosol y la mitocondria. Sitios de acción de las distintas enzimas antioxidantes.

### I. 3. Tejido adiposo

#### I. 3. 1. Morfología

El tejido adiposo se encuentra depositado en distintas localizaciones del organismo. Se distinguen dos grandes tipos de tejido adiposo, el blanco y el pardo o marrón. Ambos difieren no solamente en su coloración sino también en cuanto a la morfología, distribución, genes y función.

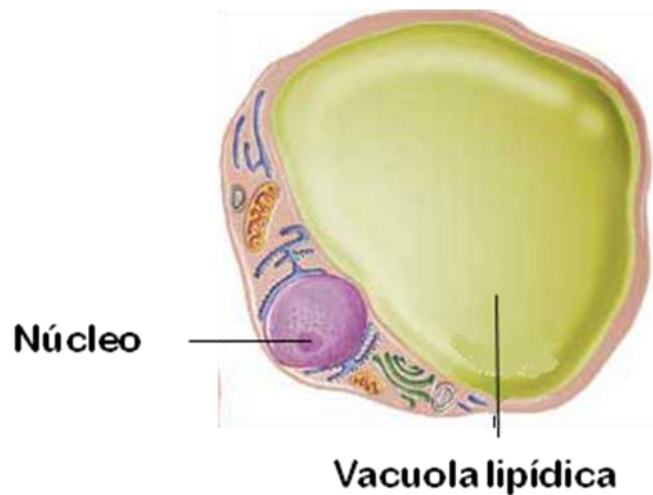


**Figura 4:** microfotografía electrónica de tejido adiposo (100x) obtenida de Kota Ichikawa y otros, 2005.

El tejido adiposo está formado por células adiposas, denominadas adipocitos (Figura 4) y un componente estroma-vascular en el que residen los preadipocitos. Los adipocitos, con un tamaño de 10 a 200 micras, son células redondeadas que contienen una vacuola lipídica que representa el 95% del peso celular y que desplaza al resto de las organelas hacia la periferia (Moreno MJ & Martínez JA, 2002).

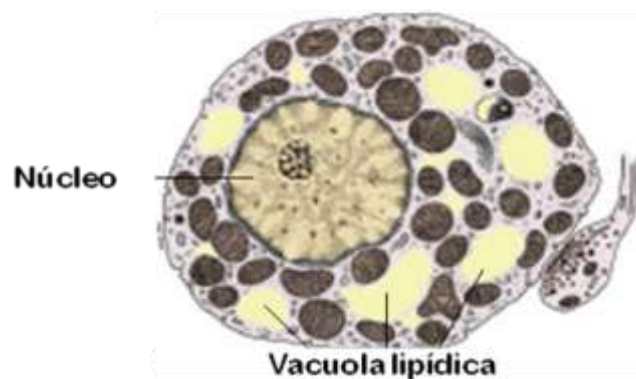
El tejido adiposo blanco está formado por adipocitos uniloculares con mitocondrias muy distintas a las del tejido pardo. Es el más abundante del organismo humano adulto y por lo tanto el mayor reservorio energético. La

energía es almacenada en las células adiposas en forma de TG. La principal fuente de TG procede de los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) circulantes. Este tejido también es considerado un liberador de ácidos grasos durante el ayuno para proporcionar combustible a otros tejidos (Figura 5).



**Figura 5:** estructura del adipocito que forma el tejido adiposo blanco.

El tejido adiposo pardo posee adipocitos multiloculares y es el encargado de la termogénesis. Su color se debe a la gran cantidad de mitocondrias que posee, las cuales expresan cantidades elevadas de UCP, que produce un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa promoviendo así la disipación de energía en forma de calor (Figura 6).



**Figura 6:** estructura del adipocito que forma el tejido adiposo pardo.

En condiciones normales el 80% del tejido adiposo está localizado en el tejido celular subcutáneo, mientras que el del 20% restante corresponde al tejido adiposo visceral. Éste está constituido por adipocitos de un tamaño más reducido, con menor capacidad de almacenamiento, más vascularizado, con mayor innervación simpática y gran número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, hecho que facilita su mayor actividad metabólica.

El aumento de la masa de tejido adiposo se debe a la participación de dos procesos; a) el aumento de tamaño de los adipocitos (hipertrofia) y b) el incremento de su número (hiperplasia), a partir de los preadipocitos mesenquimáticos. Este último proceso supone un conjunto de pasos de diferenciación en el que participa una cascada de factores de transcripción específicos, uno de los cuales es el receptor activador de la proliferación de los peroxisomas gamma (PPAR $\gamma$ ).

### I. 3. 2. Tejido adiposo como órgano endocrino

¿Qué ocurre a nivel de tejido adiposo, en especial el TAA?

El TAA produce y libera diversas adipocitoquinas que afectan procesos tales como el apetito, la secreción de insulina, la respuesta de los tejidos periféricos a esta hormona, la respuesta inflamatoria e inmune y consecuentemente la homeostasis calórica y metabólica (Kershaw EE & Flier JS, 2004; Scherer PE 2006). La administración de dietas desbalanceadas como por ejemplo, una rica en grasas, produce un aumento de la producción y liberación de ROS por el TAA y una marcada alteración del patrón de producción y liberación de sus adipocitoquinas (Bellomo A y col. 2007), con la consecuente alteración de la homeostasis mencionada. Se ha sugerido que esta alteración funcional del TAA contribuiría de manera importante al desarrollo de IR, obesidad y SM (Bellomo A y col. 2007). Dando sustento a la importancia de las dietas desbalanceadas como promotoras de EO, Busserolles y colaboradores en el 2002 demostraron que la administración de una dieta rica en sacarosa (DRS) durante dos semanas produce un aumento en la concentración plasmática y urinaria de sustancias



reductoras del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Busserolles J y col. 2002, Dai S y col. 1994, Girard A y col. 2005, Gutman RA y col. 1987, Massa ML y col. 2001, Rebolledo OR y col. 2007). Por otra parte, varios estudios han demostrado la aparición de IR en el tejido adiposo y el aumento en la liberación de ácidos grasos por parte del mismo en animales alimentados con una dieta rica en fructosa (DRF) o DRS (Massa ML y col. 2001).

Numerosos estudios experimentales demostraron que el efecto de la administración de determinados nutrientes en la dieta es capaz de modificar la respuesta de los tejidos periféricos a la insulina (Harris RBS & Kor H 1992; Lombardo YB y col. 1996; Lombardo YB y col. 1996; McDonald RB 1995; Storlien LH y col. 1988;). Thorburn y colaboradores (1989) demostraron que la molécula de D-fructosa *per se* o formando parte de la molécula de sacarosa, es la responsable de la aparición de IR en animales normales. En base a estos estudios, actualmente se emplea esta dieta para producir el modelo de IR donde la homeostasis de la glucosa está alterada así como también el metabolismo lipídico y de hidratos de carbono, generando un aumento del EO y de TG.

Desde hace unos años se conoce que el tejido adiposo blanco tiene otras funciones fisiológicas importantes tales como secretar numerosas proteínas que participan en la regulación autocrina y paracrina y afectar el funcionamiento de otros órganos, tales como el músculo, páncreas, hígado y cerebro entre otros (Pérez Mayorga M 2007). Estas proteínas secretadas, las cuales fueron denominadas bajo el término común de *citoquinas* o *adipoquinas* se hallan implicadas en los siguientes procesos:

- Desarrollo de la resistencia a la insulina (*resistina*)
- Función vascular (*angiotensina e inhibidor del plasminógeno tipo 1*),
- Regulación del peso corporal (*leptina, CRP30/adipoQ*)
- Función del sistema inmune (*TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6*)
- Función reproductiva (*estrógenos*).

Por lo tanto, se reconoce que el tejido adiposo blanco, especialmente el visceral funciona como un órgano endócrino. Estos nuevos conocimientos son importantes para comprender la relación fisiopatológica entre el exceso de grasa del cuerpo y estados patológicos, tales como la resistencia a la insulina y DMT2, sólo por nombrar alguna de ellas (Scherer PE 2006).

### I. 3. 3. Adipoquinas específicas del tejido adiposo

#### I. 3. 3. 1. Adiponectina

Es una proteína de 244 aminoácidos, con un peso de 30 kDa, que pertenece a la súper familia del colágeno y una estructura homóloga con los colágenos VIII y X y con el factor de complemento C1a-like.

En sangre se observan la forma intacta denominada “f” y la globular “g”. Es sintetizada por el adipocito del tejido visceral e inducida durante su diferenciación. Se ha demostrado que las variaciones del nivel plasmático de adiponectina dependen más del tejido adiposo visceral que del tejido adiposo subcutáneo.

La adiponectina actúa a través de 2 tipos de receptores denominados adipo R, que se hallan ampliamente distribuidos incluyendo el cerebro. El Adipo R1 está expresado primariamente en músculo esquelético, con alta afinidad por la forma globular y baja afinidad por la intacta. El receptor R2 está expresado mayormente en hígado con una afinidad intermedia para ambas formas circulantes. Por lo tanto su actividad biológica depende no sólo de los niveles circulantes sino también de las propiedades de las isoformas y de la expresión en los distintos tejidos.

Su secreción es estimulada por insulina, IGF-1(*insulin growth factor 1*), PPAR $\gamma$  y LRH-1 (*liver receptor homolog-1*). Los dos últimos activan la transcripción del gen de adiponectina mientras que el TNF- $\alpha$ , la resistina, la leptina, los glucocorticoides y la ghrelina la inhiben. La adiponectina aumenta la producción de óxido nítrico en células endoteliales y estimula la angiogénesis.

Estos efectos son mediados por la fosforilación del receptor de insulina, vía activación de la AMP-quinasa (AMPK), enzima que aumenta la sensibilidad a la

insulina. La AMPK es un sensor de la energía intracelular que es activada, en forma fisiológica, por la adiponectina y el ejercicio (Kamari y col., 2007 ).

En el músculo esquelético:

- ✓ Aumenta la fosforilación de residuos tirosina del receptor de insulina y del sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) lo que favorece la insulino-sensibilidad.
- ✓ Aumenta la captación de glucosa, por estímulo de GLUT-4, y la producción de lactato.
- ✓ Inhibe a la acetil-CoA carboxilasa favoreciendo la  $\beta$ -oxidación de AGL.
- ✓ Incrementa la actividad del PPAR- $\gamma$  induciendo aun más la oxidación de los AGL.

En hígado:

- ✓ Inhibe dos enzimas clave para la gluconeogénesis como lo son la fosfoenol-piruvato-carboxiquinasa y la glucosa-6-fosfatasa, por lo que disminuye los niveles de glucemia.

En tejido adiposo:

- ✓ Regula positivamente la acción de la lipoproteína lipasa 1 (LPL-1), por lo que aumenta el catabolismo de lipoproteínas ricas en TG.

En endotelio vascular:

- ✓ Inhibe la expresión de moléculas de adhesión (VCAM e ICAM).
- ✓ Activa la enzima NOS, aumentando la formación de NO.
- ✓ Inhibe la inducción del factor nuclear kappa beta (NFkB) por el TNF- $\alpha$ .
- ✓ Suprime la expresión de diferentes factores de crecimiento, impidiendo así la proliferación y migración de células del músculo liso vascular.
- ✓ Inhibe la expresión del receptor *scavenger* y consecuentemente la transformación de macrófagos en células espumosas.

### I. 3. 3. 2. Resistina

Es una proteína de 108 aminoácidos con un peso de 12 kDa y una estructura similar a proteínas involucradas en procesos inflamatorios. Conocida también como FIZZ3 (análogo 3 de la familia de moléculas FIZZ -*found in inflammatory zone*) posee acción hiperglucemiante). Su expresión es específica del tejido adiposo siendo 15 veces mayor en el visceral, (Banerjee R y Lazar M, 2003; Banerjee R y col., 2004). Se la identificó como un producto secretado por adipocitos de ratón, es inhibida por tiazolidindionas y se la encuentra elevada en modelos de obesidad. Hay controversia respecto a su papel en humanos, debido a que su homología con la murina no alcanza al 60%. Aunque se desconocen los mecanismos de señalización, participaría en estados inflamatorios debido a su predominante producción en monocitos y su correlación con IL-6 (Reilly y col., 2005).

### I. 3. 3. 3. Leptina

Es una hormona descubierta en 1994 como producto del gen Ob en el ratón genéticamente obeso (Ob/Ob). Es un polipéptido de 146 aminoácidos, producido a partir de un precursor de 167 aminoácidos, con una secuencia de 21 aminoácidos que se separan antes que la leptina pase a la sangre. Es estructuralmente similar a la IL-1 y secretada por los adipocitos en proporción directa a la masa de tejido adiposo, el contenido de TG y el estado nutricional (Fain JL y col., Friedman JM, 2002, 2004, Halaas J, 1995, Pelleymounter M, 1995).

La insulina, los glucocorticoides, el TNF- $\alpha$  y los estrógenos aumentan su expresión y secreción, en tanto que los andrógenos, los AGL, la actividad  $\beta$ -adrenérgica, la hormona de crecimiento y los agonistas del receptor nuclear PPAR $\gamma$  atenúan su expresión.

Su receptor es denominado Ob R y pertenece a la familia de los receptores de citoquinas. La unión de la leptina al receptor induce su dimerización. Existen varias isoformas del receptor de leptina (ObRa; ObRc) que están distribuidos en tejidos tales como hipotálamo, cerebro, riñones, pulmones, tejido adiposo, hígado,

páncreas, endotelio y corazón (Bjorbaek C, Kahn BB, 2004). La leptina aumenta la actividad de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI-3K) desencadenando señales importantes en la modulación de los efectos de la leptina sobre la insulina (Cohen B y col., 1996; Krempler F y col., 1998; Marroquí L y col., 2012). Se ha propuesto que también activa la vía de la proteína kinasa A (PKA) de forma directa e interviene en la homeostasis energética, evitando un incremento excesivo de depósitos grasos. En un estado de deficiencia de leptina, la menor activación del receptor en el hipotálamo, causa una creciente producción del neuropéptido Y (NPY), que sería el responsable de la hiperfagia, la obesidad y los cambios neuroendócrinos registrados en dicho estado (Argente J y col., 2006). A nivel hepático activa la acetil-CoA oxidasa y citrato-sintetasa e inhibe a la acetil-CoA carboxilasa (disminuye la lipogénesis en hígado y tejido graso, aumenta la  $\beta$ -oxidación y el catabolismo de los AGL vía ciclo de Krebs) y disminuye su concentración intracelular. A nivel del metabolismo hidrocarbonado estimula la utilización de glucosa por el músculo y promueve su transporte a través del intestino delgado. Sobre el metabolismo de los lípidos, estimula la lipólisis en el adipocito. También inhibe la secreción de insulina.

Aumenta la actividad fagocítica y también la producción de citoquinas proinflamatorias, la proliferación de células hematopoyéticas y la activación de células T. Promueve la angiogénesis mediante la estimulación de la proliferación de células endoteliales. Puede mejorar el flujo sanguíneo y facilitar la disipación de calor y la oxidación lipídica.

### **I. 3. 3. 4. Adipsina y proteína estimulante de acetilación (ASP)**

Es una serina proteasa secretada junto con el factor D del complemento. De su interacción con los factores C3 y B del complemento se origina la ASP, proteína que regula el metabolismo lipídico y glucémico. Ambas proteínas se correlacionan positivamente con adiposidad, IR, dislipidemia y enfermedad cardiovascular. La ASP promueve la captación de ácidos grasos por aumento de la actividad de lipoproteína lipasa (LPL), la síntesis de TG por aumento de la diacilglicerol-acil-transferasa, disminuye la lipólisis y la liberación de AGL,

aumenta el transporte de glucosa en adipocitos y potencia la secreción de insulina estimulada por glucosa.

### **I. 3. 4. Adipoquinas no específicas del tejido adiposo**

Las IL forman parte de la familia de las citoquinas. Son péptidos señal y mediadores químicos, que producen inflamación en respuesta a la agresión de un tejido.

#### **I. 3. 4. 1. IL-6**

Es una citoquina proinflamatoria multifuncional asociada con la obesidad y la IR. Tiene un peso que oscila entre 22 y 27 kDa. Regula la respuesta humoral y celular durante el proceso inflamatorio y la injuria tisular (Sprague AH & Khalil RA, 2009). Es producida por macrófagos, linfocitos T, células del músculo liso vascular, células endoteliales y adipocitos. Su receptor (IL-6R) es homólogo al de leptina y se lo encuentra en dos formas, una unida a la membrana (80 kDa) y otra soluble (50 kDa). El TNF- $\alpha$  es capaz de aumentar su producción hasta 60 veces. En condiciones de reposo, del 15 al 35% de la IL-6 proviene del tejido adiposo, especialmente del tejido adiposo visceral. Sus niveles circulantes son elevados y se correlacionan positivamente con la obesidad, la intolerancia a la glucosa y la IR. Disminuye la señalización de insulina en tejidos periféricos, inhibe la adipogénesis y disminuye la secreción de adiponectina.

#### **I. 3. 4. 2. TNF $\alpha$**

Es una proteína de 17 kDa, producida principalmente por monocitos, linfocitos T, NK (*natural killer*), tejido adiposo subcutáneo, músculo liso, células endoteliales y algunas células tumorales. Su efecto biológico es consecuencia de su unión a receptores de membrana tipo 1 y 2 expresados en el adipocito.

La concentración de ARNm del TNF $\alpha$  en el tejido adiposo se correlaciona con el índice de masa corporal, con el porcentaje de grasa corporal y con la hiperinsulinemia. Su efecto endocrino directo parece menor que los efectos indirectos que se producen por modulación tanto paracrina como autocrina vía

disminución de la captación de AGL por el TA, así como la expresión de IL-6 y adiponectina. En el TA, el TNF $\alpha$  no sólo inhibe la captación de AGL sino también la de glucosa y suprime la expresión génica de factores de transcripción relacionados con la adipogénesis y lipogénesis.

### **I. 3. 4. 3. Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)**

Es una proteína inhibidora de la formación de trombos por inhibición del activador del plasminógeno. Pertenece a la familia de inhibidores de serina proteasa y está implicado en diversos procesos biológicos tales como la angiogénesis y la aterogénesis. Su gen se localiza en el cromosoma 7, se expresa en múltiples tipos celulares. A nivel del tejido adiposo su expresión y secreción son mayores en el visceral que en el subcutáneo. En la obesidad y en la IR sus niveles están elevados y se correlacionan positivamente con el SM.

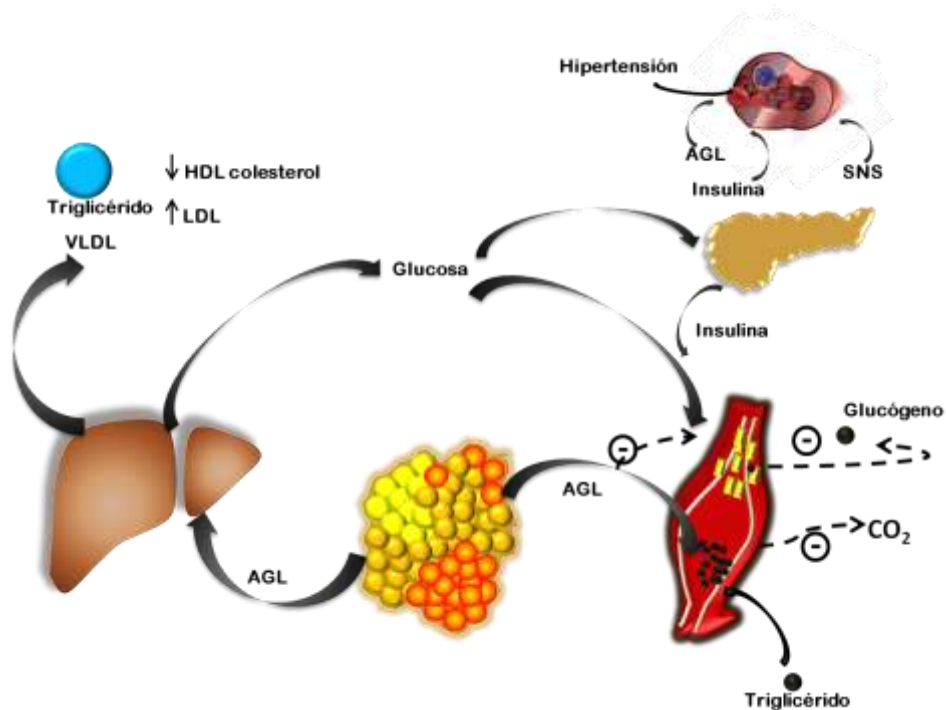
Numerosas sustancias regulan su síntesis a nivel endotelial: endotoxina, IL-1, TNF, trombina y diversos factores de crecimiento la aumentan, mientras que la insulina sería el principal inhibidor de su síntesis a nivel del hepatocito.

### **I. 4. Insulinorresistencia en el tejido adiposo abdominal**

En la fisiopatología del SM, la IR en el TAA cumple un rol muy importante ya que promueve un aumento de la lipólisis y de la liberación de AGL (Eckel RH y col. 2005, Kahn BB & Flier JS 2000). (Figura 7).

En condiciones normales, la insulina inhibe la lipólisis en el TA - efecto que disminuye en presencia de IR - lo que resulta en aumento de la liberación y la concentración de AGL circulantes. La lipólisis es un proceso regulado por una enzima denominada lipasa sensible a hormonas (HSL), (Kraemer FB & Shen WJ 2002) y por la triglicérido lipasa del TA (TGTA); ambas enzimas son responsables del 95% de la hidrólisis de TG (Schweiger M y col. 2006).

En la obesidad, la IR y la hiperinsulinemia están fuertemente asociadas con una disminución de la actividad de TGTA, HSL, mRNA y expresión proteica. También se demostró una asociación entre la predisposición genética para la IR y DMT2 con el gen de HSL. (Klannemark M y col. 1998).



**Figura 7:** Fisiopatología del SM e IR. Adaptado de RH Eckel y col. Lancet 365:1415-1428, 2005.

Numerosa evidencia sugiere que los depósitos de TA visceral contribuyen al aumento de AGL e IR. Estos depósitos son más sensibles a la lipólisis estimulada por catecolaminas. Dado que el drenaje venoso de los depósitos de tejido adiposo visceral se vierte directamente en el sistema portal, se ha postulado que en la obesidad visceral, el hígado está “bañado” con ácidos grasos hecho que favorece el desarrollo de IR (Bergman RN y col. 2007).

Como mencionáramos previamente, en condiciones patológicas el TA libera una cantidad excesiva de citoquinas proinflamatorias, existiendo controversia si ellas provienen de los adipocitos o de macrófagos derivados de monocitos (De Luca C & Olefsky JM 2008). En el 2003 Weisberg SP y colaboradores describieron la presencia de macrófagos derivados de monocitos en el TA, (Weisberg SP y col. 2003) y actualmente se conoce que un aumento de la masa de adipocitos produce mayor cantidad de citoquinas, que afectan la

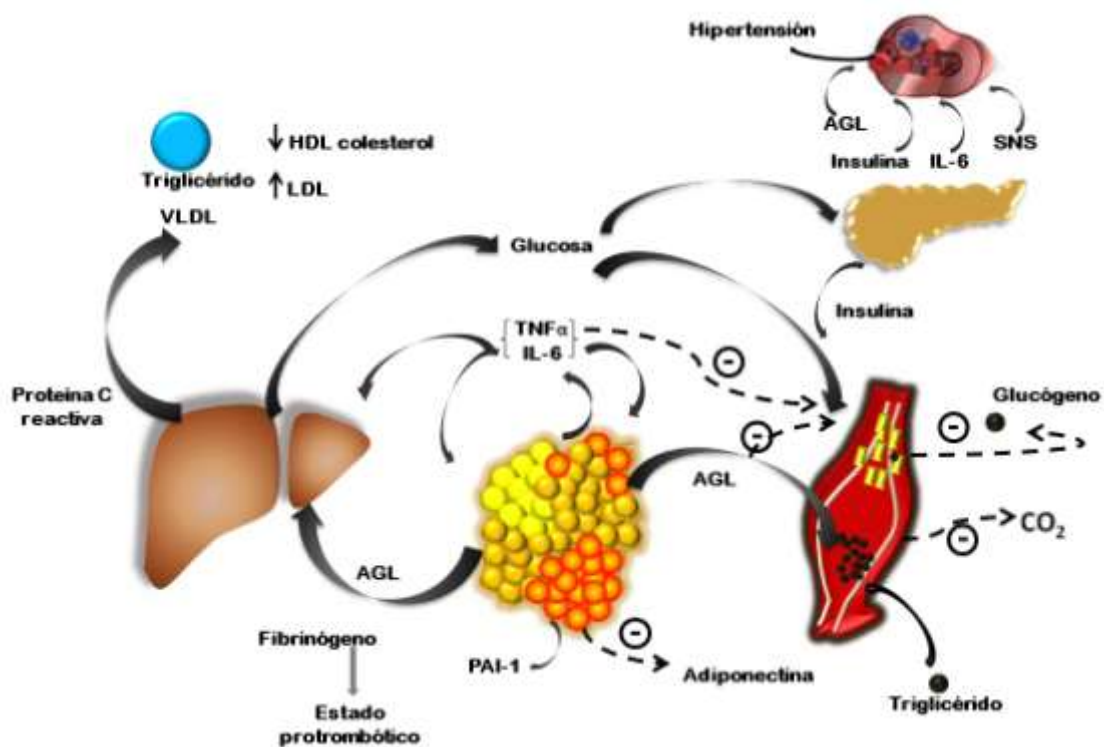


acción de la insulina no sólo en el TA sino también en otros tejidos como hígado y músculo.

En el hígado, los AGL aumentan la liberación de glucosa y TG juntamente con la secreción de VLDL, asociada a una disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y un aumento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). (Bezzerra RM y col. 2000; Catena C y col. 2003; Thorburn AW y col. 1989).

Los AGL reducen la sensibilidad a la insulina en el músculo con la consecuente inhibición de la captación de glucosa mediada por insulina.

Todos estos efectos asociados incluyen una reducción de la conversión de glucosa en glucógeno y una acumulación de lípidos.



**Figura 8:** Fisiopatología del síndrome metabólico e insulinoresistencia. Adaptado de RH Eckel y col. Lancet 365: 1415-1428, 2005.

Tanto los niveles elevados de glucosa como de los AGL aumentan la secreción de insulina produciendo un estado de hiperinsulinemia, la que a su vez

aumenta la reabsorción de sodio y la actividad del sistema nervioso simpático, que contribuiría al desarrollo de hipertensión arterial asociada a niveles elevados de AGL.

La sumatoria del estado de IR, del exceso de AGL y el efecto paracrino y endocrino, resulta en un estado proinflamatorio (Figura 8).

La IL-6 y el TNF $\alpha$ , secretados por el TA junto con otros factores, potencian la IR y el aumento de AGL provenientes de los TG almacenados. La IL-6 y otras citoquinas, también aumentan en circulación y por lo tanto aumentan la producción de glucosa, de VLDL en hígado y la IR en el músculo. Las citoquinas y los AGL incrementan la producción de fibrinógeno y de PAI-1 en el hígado, que se complementa con una sobreproducción de PAI-1 en el TA, combinación que resulta en un estado protrombótico.

En definitiva, la producción de ROS y la secreción anormal de adipocitoquinas del TAA, afectaría al resto de los tejidos incluyendo al islote de Langerhans debido a su bajo poder de neutralizar un aumento del EO (Araujo E y col., 2004; Grankvist K y col 1981; Robertson RP, 2004; Tiedge M y col. 1998).

En nuestro grupo de trabajo se demostró que la administración de una dieta rica en fructosa a ratas adultas normales induce múltiples alteraciones morfológicas, metabólicas y endocrinas tales como aumento de la masa de tejido adiposo abdominal, disminución de la masa de células  $\beta$  pancreáticas, hipertrigliceridemia, aumento de la glicosilación de proteínas plasmáticas, tolerancia a la glucosa alterada, hiperinsulinemia, insulinoresistencia, hiperleptinemia y un aumento del estrés oxidativo representado por el aumento de TBARS plasmáticos. Esta disfunción múltiple afecta a tejidos, tales como el páncreas endocrino, el hígado y el tejido adiposo, particularmente el abdominal.

La hipótesis del presente trabajo propone que esta serie de eventos se desencadenan a partir de un aumento del estrés oxidativo a nivel del tejido adiposo abdominal, con activa participación de la NADPH-oxidasa. Dicho estrés oxidativo estaría generando alteraciones en la composición y función del tejido adiposo abdominal. En consecuencia se necesita obtener evidencia experimental que de soporte a esta hipótesis por lo que se proponen los siguientes objetivos para responder a los interrogantes previamente expuestos.

### **Objetivo general**

Determinar si los cambios inducidos por la administración de una dieta rica en fructosa son secuencialmente desencadenados por un aumento del estrés oxidativo a nivel del tejido adiposo abdominal.

### **Objetivos particulares**

- 1.- Obtener animales con insulinoresistencia inducida por la alimentación con fructosa.
- 2.- Obtener animales normales y con insulinoresistencia tratados con un inhibidor de la NADPHoxidasa como es la apocinina.
- 3.- Obtener animales normales y con insulinoresistencia tratados con un potente antioxidante como el ácido  $\alpha$ -lipoico.

4.- Verificar el estado de insulinoresistencia por medio de la valoración de distintos parámetros bioquímicos (glucemia, trigliceridemia, insulinemia, perfil lipídico) y obtención del índice de insulinoresistencia (HOMA-IR).

5.- Comparar en el tejido adiposo abdominal de los distintos grupos experimentales los puntos siguientes:

- Masa
- Composición de ácidos grasos de los triglicéridos y su liberación al medio de incubación
- Cambios en el estado *redox* midiendo la peroxidación lipídica
- Contenido de antioxidantes liposolubles
- Actividad de enzimas antioxidantes
- Cambios en la expresión génica de las distintas enzimas
- Cambios en la expresión proteica de las enzimas antioxidantes

### III. 1. Reactivos y drogas empleados

Ácido  $\alpha$ -lipoico

Acrilamida (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

Agarosa (Seakem, USA)

Agua DEPC (Invitrogen Argentina S.A.)

Albúmina sérica bobina (BSA) (Fracción V, Sigma - Aldrich Chemical Co., USA)

Albúmina sérica bobina (BSA) libre de ácidos grasos (Sigma – Aldrich Chemical Co., USA)

Anticuerpo anti-insulina (Linko Research, USA)

Anticuerpos primarios para la detección de: catalasa, superóxido dismutasa I y II (SOD-I y SOD II), glutatión reductasa, (Santa Cruz Biotechnology, USA)

Anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (Vector, USA)

Apocinina (acetovanillone 98+%) (Sigma - Aldrich Chemical Co., USA)

Bis-acrilamida (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

Bromuro de etidio (Invitrogen, Argentina)

Colagenasa tipo I (Worthington, USA)

2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFA) (Fluka BioCemika, Germany)

Diaminobenzidina (DAB) (Sigma - Aldrich Chemical Co., USA)

Diphenyleneiodonium chloride (DPI) (Sigma - Aldrich Chemical Co., USA)

Fructosa en polvo (Cicarelli, Argentina)

Kit adiponectina (Linko Research, USA)

Kit colesterol (Sera Pack-Bayer, Argentina.)

Kit fructosamina (Sera Pack-Bayer, Argentina)

Kit triglicéridos (Sera Pack-Bayer, Argentina)

Kit glucemia GOD-PAP (Roche, Mannheim, Alemania)

Membrana de PVDF (Sequi-Blot PVDF Membrana, Bio-Rad)

Nitro blue tetrazolium (NBT) (Sigma - Aldrich Chemical Co., USA)

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma - Aldrich Chemical Co., USA)

Platinum taq DNA Polimerasa (Invitrogen, Argentina)

Reactivo para determinación de proteínas (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

Super Script III transcriptasa reversa (Invitrogen, Argentina)

Tiras reactivas para determinar glucemia (One touch Ultra, Lifescan, Milpitas CA, USA, Laboratorios Johnson & Johnson)

Trasyolol (aprotinina) (Bayer, Argentina)

Trizol (Gibco, Invitrogen, Argentina)

Reactivos PCR y RT (Invitrogen, Argentina)

Otras drogas y reactivos no mencionados fueron de calidad pro-análisis y adquiridos de fuentes comerciales reconocidas.

#### **III. 2. Animales**

Se utilizaron ratas macho adultas de la especie *Rattus norvegicus*, variedad Wistars. Los animales fueron provistos por la Comisión Nacional de Energía Atómica (CONEA), Centro Atómico Ezeiza U.A. Aplicaciones Tecnológicas. Se mantuvieron en el bioterio del Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata respetando las normas internacionales de tratamiento de animales para experimentación científica.

##### **III. 2. 1. Mantenimiento de los animales**

Los animales fueron mantenidos en un ambiente con temperatura y ciclos de luz/oscuridad controlados, condición importante para la obtención de resultados confiables y reproducibles. Se alojaron en una habitación con  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 50% de humedad y ciclos de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad.

Una vez ingresados los animales al bioterio se esperó aproximadamente una semana antes de iniciar el tratamiento para permitir su adaptación a las nuevas condiciones ambientales.

##### **III.2. 2. Grupos experimentales**

Se utilizaron animales con un peso corporal aproximado de 180-200 gramos los que fueron divididos en los siguientes grupos:

➤ **Control (C)**: este grupo tuvo libre acceso a la comida, la que consistió en alimento comercial estándar (alimento extrusado rata-ratón GANAVE, Santa Fé, Argentina) y agua corriente.

➤ **Tratado con fructosa (DRF)**: estos animales recibieron la misma dieta comercial que el grupo C más el agregado de fructosa al 10% en el agua de bebida. El tratamiento se mantuvo durante 21 días. La solución de fructosa se renovó de los bebederos diariamente.

➤ **Control tratado con apocinina (C-APO)**: este grupo recibió la misma dieta que el grupo C más un inhibidor de NADPH-oxidasa (apocinina o acetovanillona) en una concentración de 5mmol/L en el agua de bebida.

➤ **Tratado con fructosa más apocinina (DRF-APO)**: se repite el mismo tratamiento que en DRF más el agregado de apocinina 5mmol/L en el agua de bebida.

Finalizada esta parte del trabajo se quiso evaluar el efecto del ácido  $\alpha$ -lipoico, (1, 2, dithiolano-3-pentanoico) otro antioxidante ampliamente conocido que actúa sobre el EO mejorando la IR, la glicosilación de proteínas y que actúa como un atenuador de la producción de ROS a nivel mitocondrial. Es por ello que se ampliaron los grupos de animales realizando dos más tratados con este ácido.

➤ **Control tratado con ácido  $\alpha$ -lipoico (C-AL)**: este grupo recibió la misma dieta que el grupo C más ácido  $\alpha$ -lipoico en una dosis de 35mg /Kg de peso corporal durante los últimos 5 días de tratamiento.

➤ **Tratado con fructosa más ácido  $\alpha$ -lipoico (DRF-AL)**: se repitió el mismo tratamiento que en DRF más el agregado de ácido  $\alpha$ -lipoico en la misma dosis que para el grupo C-AL.

Durante los 21 días de tratamiento, se registró diariamente el consumo de alimento y agua. El control de peso corporal se realizó dos veces por semana en todos los grupos experimentales.

#### III. 2. 3. Obtención de sangre y plasma

Finalizado el período de tratamiento, los animales se anestesiaron con isoflurano para la recolección de muestras de sangre del plexo retroorbitario utilizando

capilares heparinizados. La sangre se recolectó en tubos con heparina y se centrifugó a 2000 xg durante 15 minutos a 4° C para obtener el plasma que se conservó a -20° C para la posterior determinación de distintos parámetros.

#### III. 3. PARÁMETROS SÉRICOS

**III. 3. 1. Glucemia:** se determinó por el método de glucosa-oxidasa GOD-PAP (Roche, Mannheim, Alemania) empleando tiras reactivas (One touch Ultra, Lifescan, Milpitas CA, USA, Laboratorios Johnson & Johnson).

**III. 3. 2. Insulinemia:** se midió por radioinmunoanálisis (RIA), utilizando un anticuerpo anti-insulina de rata y un estándar de insulina de rata (Linco Research Inc., IN, USA) e insulina porcina altamente purificada marcada con yodo 125 (Herbert V y col. 1965; Linde S y col. 1980).

**III. 3. 3. Triglicéridos:** se determinaron mediante un método enzimático (*kit* triglicéridos Sera Pack-Bayer, Argentina) utilizando un analizador automático marca Technicon RA1000.

**III. 3. 4. Fructosamina (proteínas séricas glicosiladas):** se midieron por el método colorimétrico de Johnson utilizando un analizador automático marca Technicon RA1000 y el *kit* fructosamina Sera Pack-Bayer, Argentina (Johnson RN y col. 1983).

**III. 3. 5. Leptina:** se dosó por RIA (curva estándar 0.04 – 15 ng/mL) (Walder K y col. 1997, Giovambatista A y col. 2000).

**III. 3. 6. Adiponectina:** se dosó por RIA empleando un *kit* de Linco Research, cat. #EZRADP-62 K; curva estándar 3 – 100 ng/mL).



**III. 3. 7. Índice de insulinoresistencia (HOMA-IR):** se calculó empleando los valores obtenidos de glucemia e insulinemia, aplicando la siguiente fórmula: (insulinemia ( $\mu\text{U/mL}$ ) x glucemia ( $\text{mmol/L}$ ))/22,5. (Matthews DR y col. 1985).

**III. 3. 8. Colesterol total (CT) y en fracciones lipoproteicas (C-HDL, C-LDL y C-VLDL):** el CT se determinó mediante un método enzimático (CHOD-PAP) utilizando un analizador automático marca Technicon RA1000 y el *kit* colesterol Sera Pack-Bayer, Argentina.

Las fracciones de lipoproteínas se prepararon tratando los plasmas con dextrán-sulfato (PM 50000) y  $\text{MgCl}_2$ . La suspensión permaneció 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y se centrifugó a 5000 xg durante 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . En el sobrenadante se valoró el C-HDL y el precipitado se redisolvió en buffer fosfato con tritón X-100, EGTA y guanidina para obtener la fracción VLDL + LDL para el análisis de la composición lipídica. El C-HDL y C-VLDL se calcularon mediante la fórmula:

$$\text{C-VLDL} = \text{Triglicéridos} / 5$$

$$\text{C-LDL} = \text{CT} - (\text{C-VLDL} + \text{C-HDL})$$

**III. 3. 9. Tolerancia a la glucosa intraperitoneal (TGIP):** el estudio de tolerancia a la glucosa se realizó con animales ayunados. Se les administró una dosis de glucosa intraperitoneal de 1g/Kg en solución salina. Previa anestesia con pentobarbital (48mg/Kg), se obtuvieron muestras de sangre del plexo retro-orbitario en distintos tiempos (0', 15', 30', 60' y 120'). Los resultados se expresaron como el área bajo la curva en  $\text{mmol/L/min}$ .

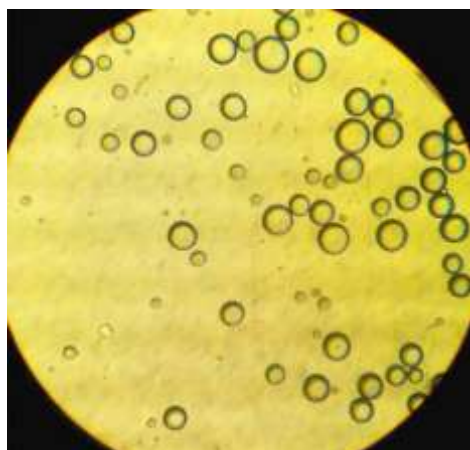
#### III. 4. PROCESAMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSO

Luego de la extracción de sangre, los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Se accedió al abdomen realizando una incisión primero en piel, luego en músculo para finalmente extraer el TAA. Las muestras se sumergieron en buffer Krebs Ringer-MOPS (KR-MOPS), cuya composición en  $\text{mmol/L}$  fue la siguiente: NaCl 118,7; KCl 4,74;  $\text{CaCl}_2$  2,54;  $\text{MgSO}_4$  1,18;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,19; MOPS 25; glucosa 3,3; albúmina sérica bovina (BSA) 4%. El pH del buffer se ajustó a 7,4. Se pesó el

TAA extraído y posteriormente se lo empleó para el desarrollo de distintos experimentos.

#### III. 4. 1. Obtención de células adiposas (adipocitos)

Una vez obtenido el tejido adiposo, se cortó en trozos pequeños, colocándolos en KR-MOPS con el agregado de colagenasa Worthington tipo I (1mg/mL y a razón de 4mL/g de tejido), se lo incubó a 37° C con agitación suave durante 45 – 60 minutos. La suspensión obtenida se filtró a través de una malla de nylon, se aspiró el infranadante y las células se lavaron 3 veces con el mismo buffer. Finalmente se diluyeron para obtener aproximadamente 100.000 células por cada mililitro de medio, lo que fue corroborado mediante el conteo en una cámara de Newbauer (Rodbell M, 1964) Figura 9.



**Figura 9:** imagen obtenida luego de realizar la digestión del TAA donde pueden observarse los adipocitos aislados (10X).

#### III. 4. 2. Incubación de adipocitos aislados

Se emplearon 100.000 células/mL en un tubo con 1,2 mL de Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) cuya composición en mmol/L fue la siguiente: NaCl 118; KCl 4,74; CaCl<sub>2</sub> 2,54; MgSO<sub>4</sub> 1,18; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,19; glucosa 3,3; BSA libre de ácidos grasos 1%. Los tubos se incubaron durante 1 hora a 37° C con agitación constante. Al finalizar la incubación se separó el medio, guardándolo para la posterior determinación de AGL (NEFA) por el método espectrofotométrico (Duncombe WG, 1963; Itaya K y UI M, 1965), NO (nitritos + nitratos) (Miles AM, 1996) y/o glicerol (Free Glycerol Determination Kit, Sigma-Aldrich, Inc.).

#### **III. 4. 3. Determinación de la composición de ácidos grasos mayoritarios y de triglicéridos**

En homogenados de tejido adiposo y alícuotas del medio de incubación se extrajeron los lípidos totales mediante el método de Folch J y col. 1957. El análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (EMAGs) obtenidos luego de transmetilación con trifluoruro de boro al 10 % en atmósfera de nitrógeno (75 ° C/45 min, seguidos de re-extracción) se realizó por medio de una columna capilar (Supelco, Avondale, PA, EEUU) montada en un equipo Hewlett Packard HP 6890 Series GC System Plus (Avondale, PA) y un sistema integral computarizado.

Los EMAGs se identificaron comparando los tiempos relativos de retención con estándares altamente purificados (Sigma Co, USA y Avanti-Polar Lipis, Canada) y la distribución de la masa se calculó automáticamente cuantificando el área debajo de los picos.

#### **III. 4. 4. Determinación de sustancias reductoras del ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

El TAA se colocó en una solución de buffer fosfato salino (PBS) cuya concentración en mmol/L fue la siguiente: NaCl 137; NaHPO<sub>4</sub> 10; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10; KCl 2,7, pH 7,4 a 4°C. Se cortó en pequeños trozos y se homogeneizó por medio de un Ultra Turrax . (JANKE & KUNKEL KG, IKA-WERK, modelo D 7813, TP 18/10, Staufen) a máxima velocidad en frío durante 2 minutos. El homogenado resultante se filtró por gasa y se ultracongeló en atmósfera de nitrógeno a -70 °C en un ultrafreezer Revco, Ultima II, (USA) hasta su determinación. Se emplearon 150µL de plasma y del homogenado de TAA a los cuales se les agregó 350µL de agua bidestilada. A esto se le adicionaron 4mL de ácido sulfúrico 0,08N y 0,5mL de ácido fosfotúngstico al 10%. La mezcla se agitó y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se centrifugó a 2000 xg 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 4mL de agua bidestilada, se agregó 1mL de ácido tiobarbitúrico al 0,70% en ácido acético al 50%. Las muestras se calentaron a 95°C durante 1 hora. Luego de enfriarlas en baño de hielo, se agregaron 3mL de butanol, se agitaron y centrifugaron a 2000

xg 10 minutos. Se transfirió la fase orgánica a placas de 96 pocillos y se leyó la DO en un espectrofluorómetro marca BioTek, modelo Synergy HT con emisión a 553nm y excitación a 515nm. La peroxidación se expresó como picomoles de malondialdehído/mg de proteína. (Yagi K, 1976).

#### **III. 4. 5. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes y contenido de antioxidantes no enzimáticos**

Algunos trozos de TAA se pesaron y sonicaron en un buffer cuya composición fue la siguiente: 50 mmol/L Tris-HCl; 1,15% KCl; 1 mmol/L N-etilmaleimida; 0,1% p/v buil-hidroxitolueno (BHT); pH 7,4. Luego se centrifugaron a 600 xg a 4° C para separar los sobrenadantes que se conservaron a -70° C en atmósfera de argón o nitrógeno hasta la medición correspondiente.

Se determinó la actividad de SOD total y sus isoformas Cu-Zn (SOD-Cu/Zn) y Mn (SOD-Mn), (Flohé L y Ötting F, 1984), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px), -reductasa (GSH-R) y -transferasa (GSH-Tr), (Habig WH, 1984; Carlberg J y Mannervick B., 1985), glutatión total (GSH total) y antioxidantes liposolubles. El contenido de glutatión oxidado (GSSG), glutatión reducido (GSH),  $\alpha$ - tocoferol,  $\beta$  caroteno y retinol se analizaron por HPLC (.Asensi M y col., 1994; Bagnati M y col.,1998; Buttriss JL., Diplock AT,1984). Para medir GSSG las muestras se obtuvieron en presencia de N-etilmaleimida como capturador de grupos -SH y se desproteinizaron con ácido tricloroacético al 15%, seguido de centrifugación a 5000 xg por 20 min a 4 °C. En todos los casos la calibración de los métodos recurrió a estándares internos obtenidos a la firma Sigma Chem. Co. (CA, USA) o Merck (Darmstadt, Alemania).

#### **III. 4. 6. Determinación de la actividad de NADPH-oxidasa**

Se emplearon adipocitos aislados de los distintos grupos experimentales para medir la actividad de la NADPHoxidasa.

Las células se incubaron en presencia de KRB en condiciones basales. En algunas muestras se colocó di-fenil-iodonium (DPI) que es un inhibidor específico de la actividad de la enzima.

La medición se realizó por colorimetría y se expresó en unidades arbitrarias (UA), utilizando la reducción de azul de nitrotetrazolio (NBT) por el radical superóxido generado por el sistema enzimático (Oliveira HR y col. 2003). Para ello se empleó un espectrofotómetro con lector de placas marca Beckman Coulter, Inc.modelo DTX 800/880, realizando la medición a una longitud de onda de 560nm.

#### **III. 4. 7. Determinación de la producción *in situ* de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

La producción de ROS intracelular se determinó utilizando diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína (DCFA). Los adipocitos aislados de los distintos grupos experimentales se incubaron durante una hora a 37° C en presencia y/o ausencia de distintos promotores de EO. Luego se incubaron con DCFA durante 30 minutos a 37° C y se lavaron dos veces con el buffer de ensayo. Las células se resuspendieron y colocaron en placas de 96 pocillos a razón de 100.000 células por cada 250 µL. La intensidad de fluorescencia se midió en un lector de placas marca Beckman Coulter, Inc.modelo DTX 800/880 con excitación 488 nm y emisión 530 nm (Moini H y col. 2002).

#### **III. 5. EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN PROTEICA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

##### **III. 5. 1. *Western blot***

Se utilizaron adipocitos aislados y homogeneizados en buffer fosfato salino, pH 7,4 para realizar la inmunodetección de las enzimas antioxidantes. La concentración proteica de cada muestra se cuantificó empleando el método de Bradford (Bio-Rad *protein assay*). La cantidad de proteína de los homogenados varió en un rango de 20 µg a 100 µg según el anticuerpo empleado.

A las muestras se les agregó ditiotreitól y azul de bromofenol a una concentración final de 100 mmol/L y 0,1%, respectivamente, y se desnaturalizaron por calentamiento a 95°C durante 5 minutos.

Las proteínas se separaron por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (Laemmli UK, 1970). El gel de acrilamida-bisacrilamida contuvo dos fracciones de diferente densidad: una en la cual se sembraron las muestras (*loading slab*, 4% de acrilamida) y la otra en la que se separaron las proteínas (*running slab*, 10% de acrilamida). La electroforesis se realizó a 20mA (constante) hasta que el frente de corrida llegó a 1 cm del borde inferior. La composición del buffer de corrida en mmol/L fue la siguiente: glicina 0,192; tris base 0,025 y SDS 0,1%.

#### III. 5. 2. Transferencia

Las distintas fracciones proteicas obtenidas se transfirieron por *electroblotting* a membranas de PVDF (Sequi-Blot, 0,2 $\mu$ m, Bio Rad). Para ello se empleó la técnica de transferencia semi-húmeda utilizando una cuba de transferencia (Trans-blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, Bio Rad) con un sistema de dos buffers (anódico y catódico) cuya composición en mmol/L fue la siguiente:

Anódico: tris base 60, CAPS 40 y metanol 15%.

Catódico: tris base 60, CAPS 40 y SDS (10%) 0.01%.

La transferencia se hizo a 88mA durante 30 minutos.

#### III. 5. 3. Inmunotinción

Luego de la transferencia, las membranas se incubaron con una solución de bloqueo (leche descremada 10% en buffer tris-HCl-salino, pH 7,5) (TBS) con agitación constante durante toda la noche a 4°C. Finalizado el bloqueo, las membranas se lavaron 3 veces con TBS + tween 20 (0,1%) durante 10 minutos.

Posteriormente se determinó la presencia de las distintas enzimas empleando anticuerpos específicos para cada una de ellas previa optimización de la concentración y del tiempo de incubación.

Luego las membranas se lavaron 2 veces durante 5 minutos con TBS + 0,05% (v/v) tween 20 y 1 vez con TBS.

Se incubaron con el segundo anticuerpo (biotinilado) durante 30 minutos y finalmente se incubaron con estreptavidina durante otros 30 minutos.

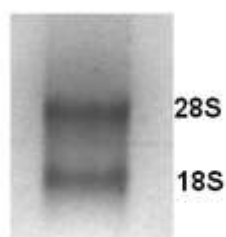
El revelado se hizo empleando diaminobenzidina (DAB, Sigma Co., St Louis, MO; EE.UU) y las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría usando un software específico para electroforesis (Gel-Pro Analyser, USA).

#### III. 6. REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA.

#### PUNTO FINAL Y TIEMPO REAL: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GENES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

##### III. 6. 1. Aislamiento de ARN total

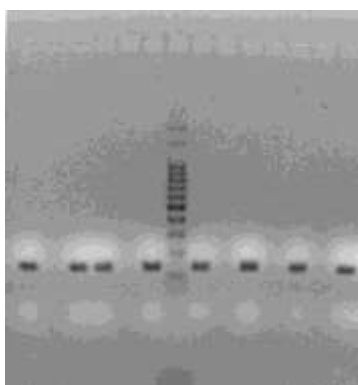
El ARN total de las muestras de adipocitos provenientes de los distintos grupos se obtuvo empleando el método de Chomczynsky y Scacchi modificado, (Chomczynsky P y Scacchi N 1987) utilizando Trizol Reagent (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA). El ARN obtenido se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua tratada con dietilpirocarbamato (DEPC). La integridad del ARN aislado se verificó por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído 1% (Sambrook J y col. 1989), verificando la presencia de las bandas características de ARNr 28s y 18s (Figura 10). La posible contaminación con proteínas o fenol se determinó midiendo el cociente de absorbancia 260/280 nm en un espectrofotómetro marca Shimadzu. La eventual contaminación con restos de ADN se evitó tratando las muestras con DNAasa I (Gibco-BRL) 1U/ $\mu$ L antes de realizar la transcripción reversa.



**Figura 10.** Integridad del ARN: ejemplo de una electroforesis en gel de agarosa-formaldehído donde se observan las dos bandas de 28S y 18S.

#### III. 6. 2. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para obtener ADNc se realizó la transcripción reversa (RT) a partir de 1µg de ARN total en presencia de la enzima transcriptasa reversa de virus de leucemia murina Moloney (SuperScript III, Gibco-BRL) 200U/µL, desoxi-nucleótidos trifosfatados (dNTPs mix) 10 mmol/L, 5X buffer, ditiotreitolo (DTT) 0.1 mol/L, RNAsa out, enzima inhibidora de ribonucleasas (Invitrogen) y oligo-dT (200-500ng) como cebadores. La inclusión de estos cebadores asegura que la reacción de RT se efectúe exclusivamente sobre los ARNm debido a que poseen una cola poli-adenilada. La RT se realizó con el siguiente protocolo: 60 minutos a 50° C y luego 15 minutos a 70° C. La posible contaminación con ADN genómico se determinó realizando un control negativo, es decir omitiendo el agregado de la enzima transcriptasa reversa. La eficiencia de este proceso se verificó realizando una PCR convencional, en un termociclador marca Biometra Personal Cycler (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) con un cebador para β actina (amplicón de 328 pb). La visualización del producto se realizó por medio de una corrida electroforética en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio como revelador.



**Figura 11:** PCR de punto final con β actina como cebador para verificar la eficiencia de la RT. Se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio.



#### III. 6. 3. Diseño de cebadores

El diseño de los cebadores (Tabla 1) se basó en las secuencias complementarias del ADNc de rata que se obtuvieron del banco de genes. Para llevar a cabo dicho diseño se empleó el programa Primer3 v.0.4.0 (Rozen S y Skaletsky H, 2000; <http://frodo.wi.mit.edu/>).

Para verificar la especificidad de los cebadores éstos se compararon con el genoma de rata utilizando Blast: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

La calidad teórica de los cebadores diseñados (posibilidad de formar horquillas, homo o hetero-dímeros) se comprobó con el programa IDTDNA (Integrated DNA Technologies – SciTools – Oligo Analyzer 3.1) que considera la temperatura de fusión de ambos cebadores.

(IDTDNA: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

Todos los cebadores los sintetizó Invitrogen Argentina y fueron probados realizando una PCR convencional utilizando una mezcla de ADNc de adipocitos de ratas como molde de la enzima Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen), en presencia de dNTPs (10mmol/L) y Mg<sup>2+</sup> (1,5mmol/L). El perfil de termociclos utilizados fue el siguiente: 3 minutos a 94°C seguido de 39 ciclos de tres pasos cada uno: 30 segundos a 94°C, (desnaturalización), 30 segundos a 65°C y 45 segundos a 72°C, finalizando con un último paso de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción de amplificación fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en presencia de bromuro de etidio y posteriormente fotografiados con un equipo de fotografía digital Kodak con filtro UV.

### III. Materiales y métodos

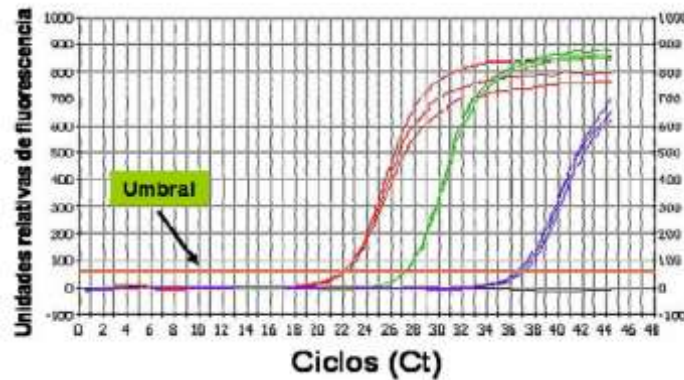
**Tabla 1:** Secuencia de los cebadores donde se incluye el nombre y la longitud en pares de bases o amplicón (pb) de los fragmentos amplificados.

Nombre		Secuencia	Amplicón (pb)
Catalasa	up	5'CCAGCGACCAGATGAAGCAG3'	198
	down	5'CCACTCTCTCAGGAATCCGC3'	
Glutation reductasa	up	5'CAACATCCCTACCGTGGTCT3'	156
	down	5'CATTTCGTCTTCCTCGTGGT3'	
SOD-1	up	5'GGAGAGCATTCCATCATTGG3'	127
	down	5'CAATCACACCACAAGCCAAG3'	
SOD-2	up	5'ACCGAGGAGAAGTACCACGA3'	130
	down	5'TAGGGCTCAGGTTTGTCCAG3'	
Actina	up	5'CGTAAAGACCTCTATGCCAA3'	328
	down	5'AGCCATGCCAAATGTCTCAT3'	
IRS1	up	5'TGTGCCAAGCAACAAGAAAG3'	176
	down	5'ACGGTTTCAGAGCAGAGGAA3'	
IRS2	up	5'CTACCCACTGAGCCCAAGAG3'	151
	down	5'CCAGGGATGAAGCAGGACTA3'	
Leptina	up	5'GAGACCTCCTCCATCTGCTG3'	176

#### III. 6. 4. Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR)

Se llevó a cabo en 25 µL de volumen final de reacción conteniendo: 5 ng de ADNc como molde equivalente a 1 µg/µL de ARN, 10X PCR buffer (Tris-HCl 200 mmol/L pH 8,4; KCl 500 mmol/L), 50 pmol/µL de cada cebador, enzima Platinum Taq Polimerasa 2,5 U, iniciadores de oligonucleótidos dNTPs mix 10 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mmol/L, sybergreen con un termociclador marca Bio-Rad modelo MJ mini (Bio-Rad Lab. Inc. USA). El perfil de ciclos térmicos fue el siguiente: un único paso de 3 minutos a 94°C seguido de 39 ciclos de tres pasos: 30 segundos a 94°C, (desnaturalización), 30 segundos a 65°C y 45 segundos a 72°C, finalizando con

un último paso de 10 minutos a 72°C. En cada ciclo se registró la fluorescencia emitida por cada uno de los tubos. (Magocsi M y col., 1992). (Figura 12).



**Figura 12:** Ejemplo de una qPCR donde puede observarse la emisión de fluorescencia en los distintos ciclos y para cada tubo.

Al término de los ciclos de amplificación y para verificar la especificidad de los cebadores se efectuó una curva de fusión (*melting*) en la que se aumentó la temperatura desde 55 a 90°C, tomando el registro de la fluorescencia cada medio grado de temperatura. El incremento de temperatura genera la ruptura o desnaturalización de la estructura de doble hebra del 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 indica que existe más de un producto de amplificación y por lo tanto ese cebador no tiene buena especificidad.

Se evaluó la eficiencia (E) individual para cada par de cebadores calculada con una curva estándar y el parámetro conocido como ciclo umbral o Ct (proveniente del vocablo inglés *cycle threshold*). La curva estándar se efectuó con diluciones seriadas de una mezcla de muestras de ADNc obtenidas del TAA de varios animales de cada grupo. El método de cuantificación elegido fue descrito por Pfaffl (2001), en el que se evalúan los niveles de cada producto de amplificación

en relación a los del estándar interno ( $\beta$ -actina) y entre los diferentes grupos experimentales.

La identidad y pureza de los productos obtenidos se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE (Tris base 40 mmol/L, ácido acético glacial 40 mmol/L, EDTA 1 mmol/L pH 8,0) en presencia de bromuro de etidio como revelador y con posterior exposición a luz ultravioleta. Las imágenes obtenidas se capturaron empleando un equipo Kodak.

#### **III. 7. Análisis estadístico de los resultados**

El análisis estadístico de los resultados se realizó empleando el test de  $t$  de Student para muestras independientes. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Las diferencias se consideraron significativas cuando la probabilidad ( $p$ ) fuera menor a 0,05.

### IV. 1. Modelo experimental de dismetabolismo y estrés oxidativo inducido por la administración de dieta rica en fructosa

#### IV. 1. 1. Composición de la dieta, consumo diario de masa y calorías

Dado que el agregado de fructosa en el agua de bebida de los animales tratados cambia la composición de la dieta se midió el consumo de alimento y agua diariamente para determinar el total de calorías ingeridas a lo largo del tratamiento.

En la tabla 2 se puede observar que los animales controles consumieron mayor cantidad de alimento sólido que los tratados (C:  $18,3 \pm 2,02$  vs DRF:  $10,7 \pm 0,67$  g/animal/día;  $p < 0,004$ ); en cambio, los animales del grupo tratado con fructosa bebieron mayor volumen de líquido que los del grupo control (C:  $34,5 \pm 3,3$  vs DRF:  $55,4 \pm 3,6$  mL/animal/día;  $p < 0,005$ ), lo que implica un mayor consumo de fructosa, por lo que estos animales consumieron un promedio de 5,54 gramos de hidratos de carbono más que los animales del grupo C.

En la dieta estándar que ingirieron ambos grupos, los hidratos de carbono, proteínas y lípidos representaron el 62,8% del peso del alimento, mientras que el porcentaje restante estuvo compuesto por cenizas y fibras que no aportaron valor calórico. La relación de hidratos de carbono, proteínas y lípidos de esta dieta comercial fue: 45: 43:12 % respectivamente. El aporte agregado de fructosa en los animales DRF modificó esta relación de nutrientes produciendo un aumento en la proporción de hidratos de carbono a expensas de la disminución de proteínas y lípidos. Finalmente, la relación resultante con este tratamiento fue: 64: 28: 8 % respectivamente.

A pesar de este cambio en la proporción de nutrientes, la ingesta calórica diaria fue similar en ambos grupos debido a que los animales DRF consumieron menor cantidad de alimento sólido que los del grupo C.

El tratamiento con apocinina no produjo ningún cambio en la ingesta de nutrientes con lo cual tampoco cambió el aporte calórico (resultados no mostrados).

**Tabla 2:** Consumo y composición diaria de alimento.

	Alimento consumido (g/animal/día)	Proporción de nutrientes (%)			Calorías (Kcal)
		Hidratos de Carbono	Proteínas	Lípidos	
<b>C</b>	18,3 ± 2,02	45	43	12	52,6 ± 5,8
<b>DRF</b>	10,7 ± 0,67	64	28	8	48,3 ± 2,6

En la tabla 2 se muestra el promedio de alimento ingerido, la composición de nutrientes y calorías consumidas por animal y por día para ambos grupos. Los datos expresan la media ± EEM de 30 animales por grupo. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

#### IV. 1. 2. Efecto de la dieta rica en fructosa sobre el peso corporal

Los animales de todos los grupos experimentales comenzaron y finalizaron el tratamiento con pesos similares sin tener diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Peso corporal

Peso (g)	<b>C</b>	<b>DRF</b>	<b>C-APO</b>	<b>DRF-APO</b>
Inicial	192,4 ± 1,7	190,4 ± 1,2	192,7 ± 2,2	193,7 ± 1,6
Final	282,4 ± 6,1	295,1 ± 4,8	274,5 ± 6,9	279,6 ± 6,4

En la tabla 3 se colocaron los pesos iniciales y finales de los cuatro grupos no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. El peso inicial y final está expresado en gramos. Los resultados expresan la media ± el EEM de 30 animales por grupo. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

#### IV. 2. Marcadores plasmáticos del dismetabolismo inducido por la dieta rica en fructosa

Para comprobar la presencia del estado de alteración del metabolismo en los distintos grupos experimentales al cabo de los 21 días de tratamiento, se determinaron los valores de glucosa, TG, insulina, NEFA, fructosamina, leptina, TBARS y TGIP.

**Tabla 4:** Marcadores metabólicos, endocrinos y de estrés oxidativo

Parámetro	C	DRF	C-APO	DRF-APO
<b>Glucosa</b> (mmol/L)	6,29 ± 0,09	6,30 ± 0,20	5,69 ± 0,15	6,06 ± 0,19
<b>Triglicéridos</b> (mmol/L)	0,87 ± 0,05	1,72 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,09	1,43 ± 0,13 <sup>b</sup>
<b>Insulina</b> (μU/mL)	23,1 ± 3,44	43,89 ± 4,14 <sup>a</sup>	22,91 ± 3,44	28,74 ± 5,24 <sup>d</sup>
<b>NEFA</b> (mmol/L)	0,59 ± 0,04	0,77 ± 0,05 <sup>d</sup>	0,58 ± 0,08	0,43 ± 0,05 <sup>d</sup>
<b>Fructosamina</b> (μmol/L)	146,2 ± 5,60	162,6 ± 3,30 <sup>c</sup>	134,1 ± 12,20	105,4 ± 18,4 <sup>b</sup>
<b>Leptina</b> (ng/ml)	4,90 ± 0,34	6,43 ± 0,51 <sup>c</sup>	4,20 ± 0,57	4,15 ± 0,83 <sup>c</sup>
<b>TBARS</b> (nmol/mg)	58,72 ± 4,45	73,71 ± 5,51 <sup>d</sup>	68,97 ± 4,45	67,10 ± 5,51
<b>TGIP</b> (mmol/L/min)	1,34 ± 0,15	2,25 ± 0,28 <sup>e</sup>	1,26 ± 0,11	2,03 ± 0,33
<b>HOMA - IR</b>	6,53 ± 0,99	12,32 ± 1,27 <sup>a</sup>	5,88 ± 0,91	7,96 ± 1,54 <sup>d</sup>

Los resultados corresponden a la media ± EEM. (n= 30 animales por grupo).

C vs DRF, DRF vs DRF-APO: <sup>a</sup>p< 0,001; <sup>b</sup>p< 0,005; <sup>c</sup>p< 0,02; <sup>d</sup>p< 0,05; <sup>e</sup>p< 0,01.

Pudo observarse que hay un importante aumento de los parámetros estudiados en los animales DRF así como también en el índice HOMA de insulinoresistencia (HOMA-IR). Todos estos parámetros fueron mejorados con el

tratamiento con apocinina, alcanzando en algunos casos el valor del control. (Tabla 4).

### IV. 3. Perfil lipídico sérico en los distintos grupos

Continuando con el estudio en plasma, se estudió el colesterol total plasmático (CT) encontrándose que fue similar en todos los grupos. En el análisis de las sub fracciones de lipoproteínas, las fracciones de colesterol HDL (C-HDL) y colesterol LDL (C-LDL) disminuyeron mientras que la del colesterol-VLDL (C-VLDL) fue mayor en ratas DRF así como también la relación entre CT/C-HDL y triglicéridos (TG)/ (TG/C-HDL). El tratamiento con apocinina produjo cambios en algunas de las fracciones (C-HDL, C-LDL, C-VLDL, CT/C-HDL y TG/C-HDL) aproximándolas al correspondiente valor control (Tabla 5).

**Tabla 5:** Distribución del colesterol en las distintas fracciones de lipoproteínas

	<b>C</b>	<b>DRF</b>	<b>C-APO</b>	<b>DRF-APO</b>
<b>CT (mmol/L)</b>	2,06 ± 0,07	1,91 ± 0,11	2,07 ± 0,11	2,24 ± 0,11
<b>C-HDL (mmol/L)</b>	0,80 ± 0,04	0,58 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,86 ± 0,07	0,84 ± 0,07 <sup>b</sup>
<b>C-LDL (mmol/L)</b>	0,83 ± 0,09	0,50 ± 0,12 <sup>d</sup>	1,04 ± 0,07	1,09 ± 0,09 <sup>a</sup>
<b>C-VLDL (mmol/L)</b>	0,44 ± 0,05	0,83 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>e</sup>	0,31 ± 0,04 <sup>e</sup>
<b>CT/C-HDL</b>	2,64 ± 0,16	3,30 ± 0,11 <sup>b</sup>	2,47 ± 0,15	2,76 ± 0,22
<b>TG/C-HDL</b>	1,23 ± 0,17	3,20 ± 0,34 <sup>a</sup>	1,04 ± 0,14	1,88 ± 0,26 <sup>c</sup>

Los valores representan la media ± EEM (n= 8 animales por grupo).

C vs DRF: <sup>a</sup> p< 0,005; <sup>b</sup> p< 0,01; <sup>c</sup> p< 0,025; <sup>d</sup> p< 0,05; <sup>e</sup> p< 0,001.



### **IV. 3. 1. Composición de ácidos grasos de triglicéridos y fosfolípidos de las fracciones de HDL y VLDL+LDL plasmáticas**

En el grupo DRF, los ácidos grasos saturados palmítico (16:0) y esteárico (18:0) se encontraron aumentados mientras que los monoinsaturados y los poliinsaturados (PUFA) disminuyeron con respecto al grupo C. Las relaciones de saturados/monoinsaturados y saturados/PUFA estuvieron aumentadas en DRF, mientras que la relación eicosatrienoico/araquidónico (20:3/20:4) se encontró significativamente disminuida con respecto al grupo C (Tabla 6)

En las ratas DRF se encontró disminuido el contenido de ácido linoleico (18:2 n-6) en la fracción VLDL + LDL. En estos animales el análisis de relaciones entre componentes analíticos demostró un cambio significativo similar a la fracción C-HDL, especialmente en la relación ácidos grasos saturados/monoinsaturados y saturados/PUFA (Tabla 7).

**Tabla 6:** Composición de ácidos grasos de la fracción HDL

Ácido graso	C	DRF
14:0	0,10 ± 0,02	0,20 ± 0,01 <sup>a</sup>
16:0	10,0 ± 2,00	17,5 ± 0,90 <sup>b</sup>
16:1	2,20 ± 0,20	1,50 ± 0,10 <sup>c</sup>
18:0	10,30 ± 0,30	18,1 ± 0,60 <sup>a</sup>
18:1	19,90 ± 0,50	13,2 ± 0,10 <sup>a</sup>
18:2 <i>n</i> -6	24,20 ± 1,00	21,9 ± 0,90
18:3 <i>n</i> -3	0,20 ± 0,02	0,10 ± 0,01 <sup>b</sup>
20:3 <i>n</i> -6	1,10 ± 0,03	0,40 ± 0,01 <sup>a</sup>
20:4 <i>n</i> -6	32,0 ± 3,00	27,1 ± 1,80
Σ Sat/Σ Mon	0,93 ± 0,10	2,40 ± 0,15 <sup>a</sup>
18:2/20:4	0,76 ± 0,05	0,80 ± 0,04
20:3/20:4	0,03 ± 0,001	0,01 ± 0,002 <sup>a</sup>
Σ PUFAs	57,5 ± 3,80	49,5 ± 3,00
Σ Sat/Σ PUFA	0,35 ± 0,04	0,72 ± 0,03 <sup>a</sup>

Los valores representan la media ± EEM (n= 14 animales por grupo).

C vs DRF: <sup>a</sup>, p< 0,001; <sup>b</sup>, p< 0,05.

**Tabla 7:** Composición de ácidos grasos de la fracción VLDL + LDL

Ácido graso	C	DRF
14:0	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,01
16:0	25,3 ± 2,2	29,8 ± 2,0
16:1	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1
18:0	16,5 ± 0,9	19,1 ± 1,1
18:1	15,8 ± 0,7	14,2 ± 1,3
18:2 <i>n</i> -6	13,6 ± 0,5	11,4 ± 0,8 <sup>c</sup>
18:3 <i>n</i> -3	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01
20:3 <i>n</i> -6	0,3 ± 0,02	0,4 ± 0,02 <sup>b</sup>
20:4 <i>n</i> -6	26,5 ± 3,1	23,3 ± 2,2
Σ Sat/Σ Mon	2,4 ± 0,12	3,12 ± 0,11 <sup>a</sup>
18:2/20:4	0,51 ± 0,04	0,49 ± 0,05
20:3/20:4	0,01 ± 0,002	0,02 ± 0,003
Σ PUFAs	40,5 ± 3,4	35,2 ± 2,9
Σ Sat/Σ PUFA	1,04 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,39 ± 0,04 <sup>a</sup>

Los valores representan la media ± EEM (n= 14 animales por grupo).

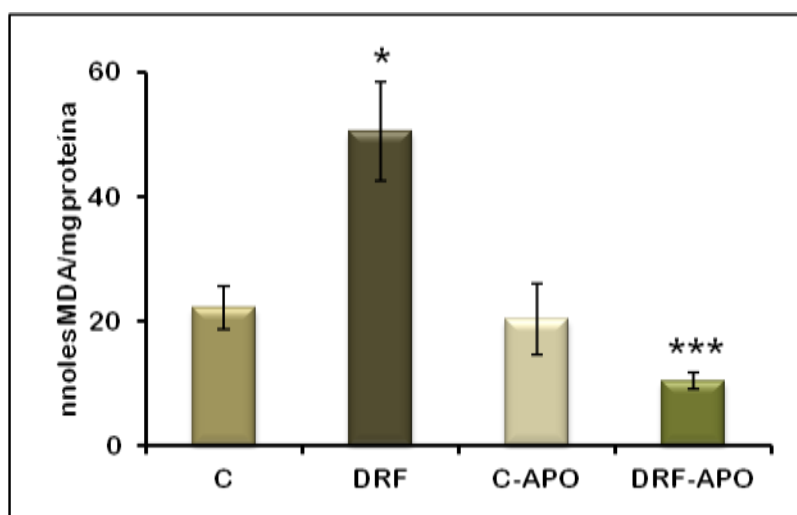
C vs DRF: <sup>a</sup> p< 0,001; <sup>b</sup> p< 0,005, <sup>c</sup> p< 0,05.

#### IV. 4. Tejido Adiposo Abdominal.

##### Marcadores metabólicos y de estrés oxidativo inducidos por la dieta rica en fructosa

#### IV. 4. 1. Contenido de TBARS en TAA

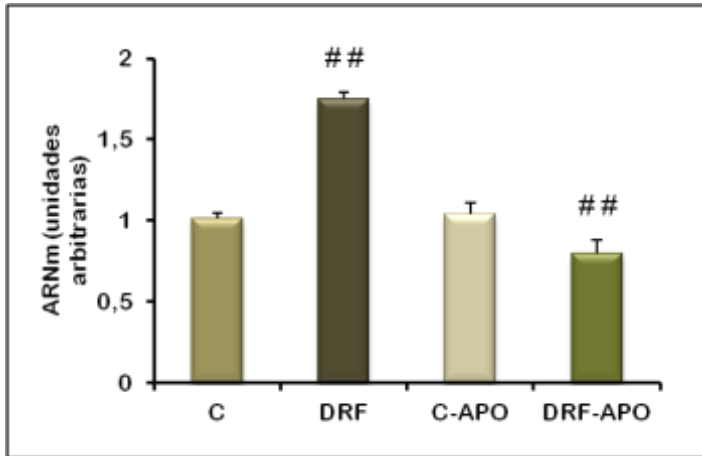
La concentración de TBARS medidos en el TAA presentó un aumento significativo en los animales DRF con respecto al grupo C ( $50,5 \pm 7,99$  vs  $22,13 \pm 3,51$ ). El tratamiento con apocinina no modificó los valores de C-APO mientras que los de DRF-APO disminuyeron significativamente con respecto a su control (C-APO,  $20,31 \pm 5,80$ ; DRF-APO  $10,35 \pm 1,33$  (Figura 13).



**Figura 13:** Producción de TBARS expresado como nmoles de malondialdehído (MDA) por miligramo de proteína. Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de 8 animales por grupo. C vs DRF \*  $p < 0,02$ , DRF vs DRF-APO \*\*\*  $p < 0,005$ .

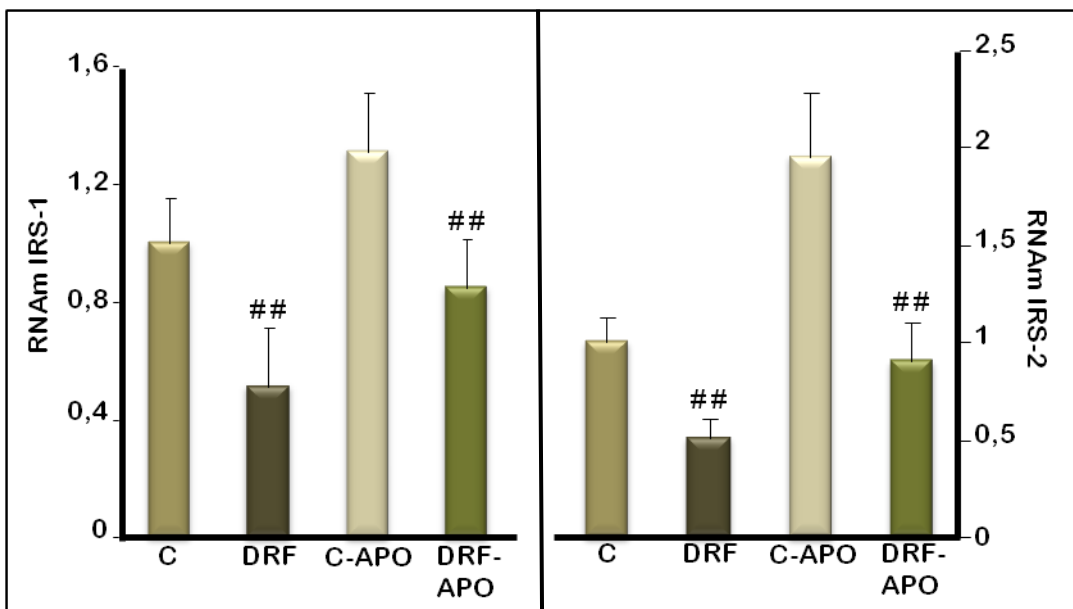
#### IV. 4. 2. Expresión del gen de leptina y de los receptores de insulina 1 y 2

En homogenados de TAA se estudió la expresión del gen de leptina, encontrándose aumentado en los animales DRF con respecto al grupo experimental C. En el grupo DRF-APO disminuyó la expresión del gen aproximando los valores al del grupo control (Figura 14).



**Figura 14.** Expresión del gen de leptina. Las barras representan la concentración de ARNm del TAA de los distintos grupos. Los datos corresponden a 5 animales por grupo y fueron expresados como unidades arbitrarias. C *vs* DRF, DRF *vs* DRF-APO <sup>##</sup> p < 0,05

Con respecto a la expresión de los receptores de insulina, tanto el IRS-1 como el IRS-2, en DRF se encuentran significativamente disminuidos con respecto a los controles, en tanto que el tratamiento con apocinina recuperó su expresión hasta alcanzar valores intermedios entre el grupo control y suplementado. (Figura 15).



**Figura 15.** Expresión del gen de IRS-1 e IRS-2: Las barras representan la concentración de ARNm del TAA de los distintos grupos. Los datos fueron expresados como unidades arbitrarias y corresponden a 5 animales por grupo. C *vs* DRF, DRF *vs* DRF-APO <sup>##</sup> p < 0,05.

#### IV. 4. 3. Determinación de la composición de ácidos grasos mayoritarios de triglicéridos del tejido adiposo abdominal

Los animales DRF aumentaron los ácidos grasos saturados palmítico (16:0) y esteárico (18:0) (Tabla 8).

**Tabla 8:** Composición de ácidos grasos del TAA

Ácido graso	C	DRF	C-APO	DRF-APO
14:0	2,2 ± 0,1	2,6 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
16:0	30,3 ± 1,5	35,3 ± 1,4 <sup>a</sup>	29,6 ± 1,1	31,6 ± 1,2
16:1	1,8 ± 0,1	1,5 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1 <sup>b</sup>
18:0	22,2 ± 1,0	26,3 ± 0,8 <sup>c</sup>	23,3 ± 1,1	23,5 ± 0,6 <sup>a</sup>
18:1	12,0 ± 0,7	10,2 ± 0,5	11,9 ± 0,5	12,3 ± 0,2 <sup>b</sup>
18:2 n-6	18,0 ± 0,7	16,6 ± 0,8	17,3 ± 0,8	17,8 ± 0,4
18:3 n-3	0,9 ± 0,03	0,5 ± 0,05 <sup>d</sup>	0,8 ± 0,03	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
20:3 n-6	0,8 ± 0,01	0,8 ± 0,03	0,7 ± 0,02 <sup>e</sup>	0,9 ± 0,05
20:4 n-6	23,5 ± 1,1	17,3 ± 0,9 <sup>e</sup>	24,3 ± 1,0	24,8 ± 0,8 <sup>d</sup>
Σ Sat.	54,7 ± 2,3	64,6 ± 1,9 <sup>c</sup>	54,9 ± 2,0	57,1 ± 1,9 <sup>a</sup>
Σ Mon.	13,8 ± 0,8	11,7 ± 0,6 <sup>b</sup>	13,4 ± 0,8	14,3 ± 0,9
Σ Sat/Σ Mon	4,0 ± 0,1	5,5 ± 0,1 <sup>d</sup>	4,1 ± 0,05	4,0 ± 0,01 <sup>d</sup>
18:2/20:4	0,8 ± 0,05	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,05	0,7 ± 0,03
20:3/20:4	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Σ PUFA	25,2 ± 0,6	18,6 ± 0,4 <sup>d</sup>	25,8 ± 0,8	26,5 ± 0,9 <sup>d</sup>
Σ Sat/Σ PUFA	2,2 ± 0,1	3,5 ± 0,1 <sup>d</sup>	2,1 ± 0,05	2,2 ± 0,1 <sup>d</sup>

Los valores son expresados en μmoles/mg de tejido para cada ácido graso y corresponden a 8 animales por grupo. C *vs* DRF, C *vs* C-APO, DRF *vs* DRF-APO <sup>a</sup>p< 0,05; <sup>b</sup>p< 0,01; <sup>c</sup>p< 0,02; <sup>d</sup>p< 0,001; <sup>e</sup>p< 0,005

Los ácidos grasos monoinsaturados, como el palmitoleico (16:1) y el oleico (18:1) mostraron una reducción del 15-16%. Dentro de los poliinsaturados (PUFA) el ácido γ-linolénico (18:3) y el araquidónico (20:4) disminuyeron con respecto al

grupo C. El tratamiento con apocinina de los animales DRF recuperó los valores del grupo control. La sumatoria de los ácidos grasos monoinsaturados mostró una disminución en las ratas DRF, cuadro que fue revertido por la administración de apocinina. Los PUFA mostraron una disminución significativa en los animales DRF, mientras que la relación saturados/monoinsaturados y los saturados/PUFA fue mayor que en el grupo control.

#### **IV. 4. 4. Actividad de enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos**

Cuando se midió la actividad de las enzimas que conforman el sistema antioxidante presente en el TAA como la SOD total y las isoformas dependientes de cobre-zinc y manganeso, CAT, GSH-Px y GSH-R (Tabla 9), encontramos que en los animales DRF estaban todas aumentadas. Por otro lado, cuando se estudió el sistema antioxidante no enzimático en las ratas DRF observamos una disminución en la concentración de glutatión reducido (GSH) y un incremento de la del oxidado (GSSG). En consecuencia, la relación entre ambos disminuyó en las ratas DRF. Los antioxidantes liposolubles disminuyeron con respecto al grupo C. El tratamiento con apocinina aproximó al grupo C todos los valores antes mencionados.

**Tabla 9:** Actividad de enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos en el TAA

Parámetro	C	DRF	C-APO	DRF-APO
SOD total	4,56 ± 0,05	8,81 ± 0,07 <sup>a</sup>	4,27 ± 0,04 <sup>b</sup>	6,12 ± 0,03 <sup>a</sup>
SOD-Cu/Zn	3,78 ± 0,03	7,06 ± 0,06 <sup>a</sup>	3,35 ± 0,02 <sup>c</sup>	4,88 ± 0,03 <sup>a</sup>
SOD-Mn	0,78 ± 0,01	1,75 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,24 ± 0,02 <sup>e</sup>
Catalasa	0,55 ± 0,02	1,72 ± 0,06 <sup>e</sup>	0,51 ± 0,05	0,70 ± 0,02 <sup>e</sup>
GSH-Px	3,3 ± 0,05	5,4 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,02 <sup>c</sup>	3,8 ± 0,02 <sup>a</sup>
GSH-Tr	8,6 ± 0,10	7,5 ± 0,15 <sup>a</sup>	7,7 ± 0,25 <sup>d</sup>	8,1 ± 0,25
GSH-R	6,0 ± 0,15	11,7 ± 0,30 <sup>e</sup>	5,3 ± 0,25	8,4 ± 0,20 <sup>d</sup>
GSH total	35,6 ± 0,75	36,8 ± 0,45	34,2 ± 0,60	38,6 ± 0,70
GSH	31,15 ± 0,55	27,78 ± 0,35 <sup>e</sup>	30,10 ± 0,5	31,94 ± 0,60 <sup>a</sup>
GSSG	4,45 ± 0,15	9,02 ± 0,25 <sup>a</sup>	4,10 ± 0,10	6,66 ± 0,20 <sup>a</sup>
GSH/GSSG	7,0 ± 0,10	3,1 ± 0,05 <sup>a</sup>	7,3 ± 0,15	4,8 ± 0,05 <sup>a</sup>
Retinol	0,56 ± 0,02	0,22 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,05	0,35 ± 0,02 <sup>e</sup>
β carotenoides	1,15 ± 0,06	0,78 ± 0,03 <sup>e</sup>	0,99 ± 0,05	1,19 ± 0,04 <sup>a</sup>
α tocoferol	202,5 ± 5,15	174,4 ± 2,95 <sup>e</sup>	222,2 ± 4,80 <sup>b</sup>	197,3 ± 3,15 <sup>e</sup>
Licopenos	0,30 ± 0,005	0,25 ± 0,03	0,29 ± 0,06	0,36 ± 0,04

Las enzimas antioxidantes fueron expresadas en U/mg, el GSH total en nmol/g y los antioxidantes no-enzimáticos en µg/g. Los resultados del TAA representaron la media ± EEM de 5 experimentos. C vs DRF, C vs C-APO, DRF vs DRF-APO <sup>a</sup> p < 0,001; <sup>b</sup> p < 0,05; <sup>c</sup> p < 0,01; <sup>d</sup> p < 0,02; <sup>e</sup> p < 0,005.

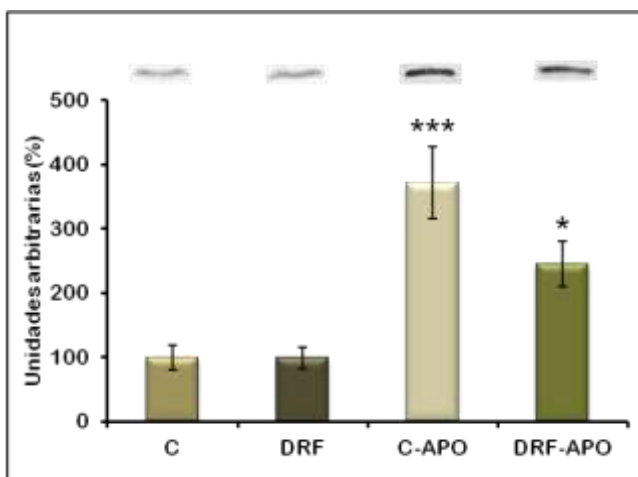
#### IV. 4. 5. Expresión de enzimas antioxidantes

La expresión de las distintas enzimas se determinó mediante *Western blot* y la expresión de los genes por reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR). A continuación se describen los resultados de ambas determinaciones con cada una de las enzimas.



**IV. 4. 5. 1. Superoxido dismutasa 1 (SOD-1)**

El contenido de proteína para SOD1 no fue estadísticamente significativo entre C y DRF. El tratamiento con apocinina aumentó el contenido por encima de los valores de los respectivos controles (Figura 16).

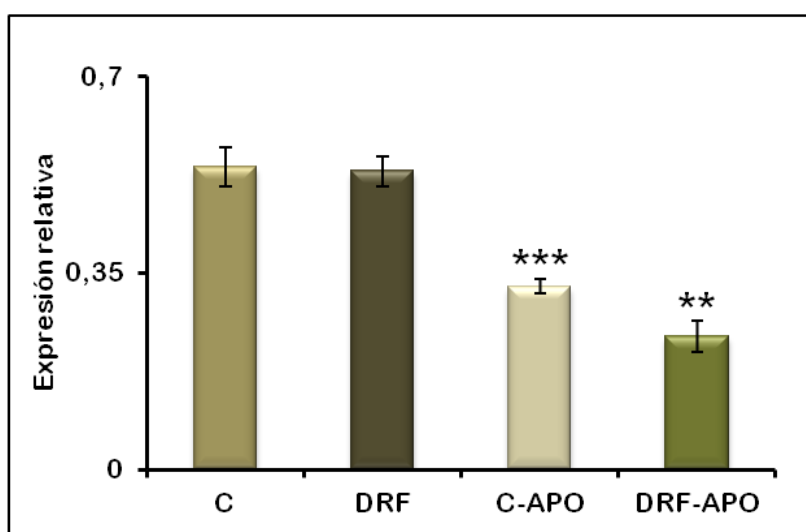


**Figura 16.** Contenido de proteína para SOD-1. Las barras representan los resultados obtenidos en el TAA en presencia del anticuerpo específico para SOD1. En la parte superior se muestra el ejemplo de una corrida electroforética.

Las barras corresponden a la cuantificación realizada y representan el promedio  $\pm$  EEM de 5 ensayos.

C *vs* C-APO \*\*\*  $p < 0,005$ ; DRF *vs* DRF-APO \*  $p < 0,02$

Cuando se estudió la expresión génica de esta misma enzima, no se encontraron cambios entre C y DRF, pero si una franca disminución en los animales tratados con apocinina (Figura 17).

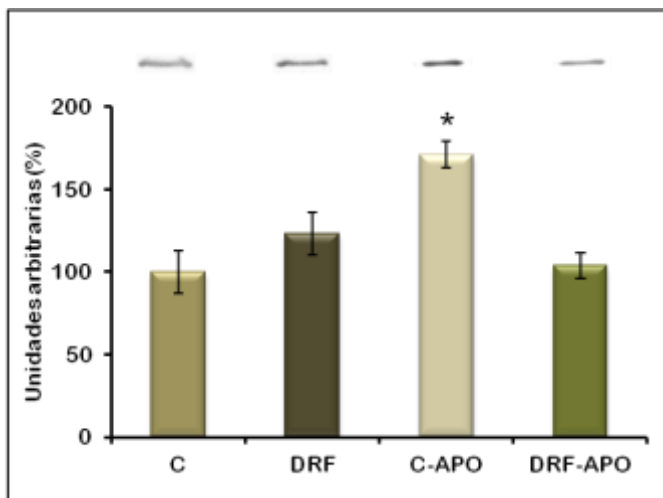


**Figura17.** qPCR. En la figura se observan los promedios  $\pm$  EEM de 5 ensayos realizados por triplicado.

C *vs* C-APO \*\*\*  $p < 0,005$ ; DRF *vs* DRF-APO \*\*  $p < 0,001$

**IV. 4. 5. 2. Superoxido dismutasa 2 (SOD-2)**

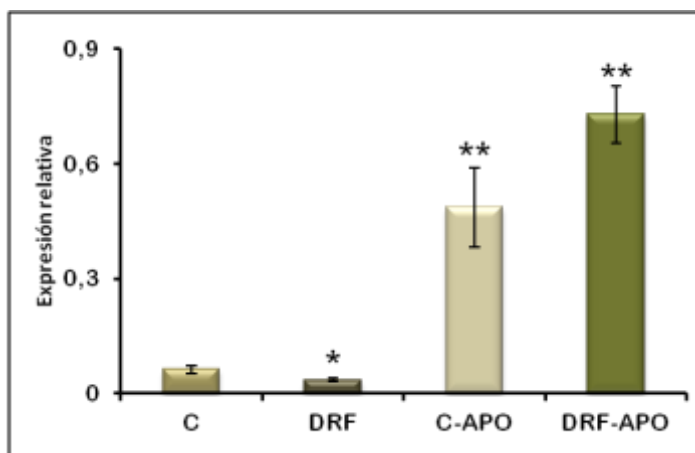
El contenido de proteína correspondiente a SOD2 no fue diferente entre C y DRF mientras que el tratamiento con apocinina aumentó los valores significativamente en el grupo C-APO, no habiendo cambios en DRF-APO con respecto al control (Figura 18).



**Figura 18.** Contenido de proteína para SOD-2. Las barras representan los resultados obtenidos en el TAA en presencia del anticuerpo específico para SOD2. En la parte superior se muestra el ejemplo de una corrida electroforética. Las barras corresponden a la cuantificación realizada y representan el promedio  $\pm$  EEM de 5 ensayos.

C vs C-APO \*  $p < 0,02$

La expresión génica de SOD-2, estuvo disminuida en las ratas DRF con respecto al grupo C. El tratamiento con apocinina elevó la expresión por encima del valor control en ambos grupos tratados (Figura 19).

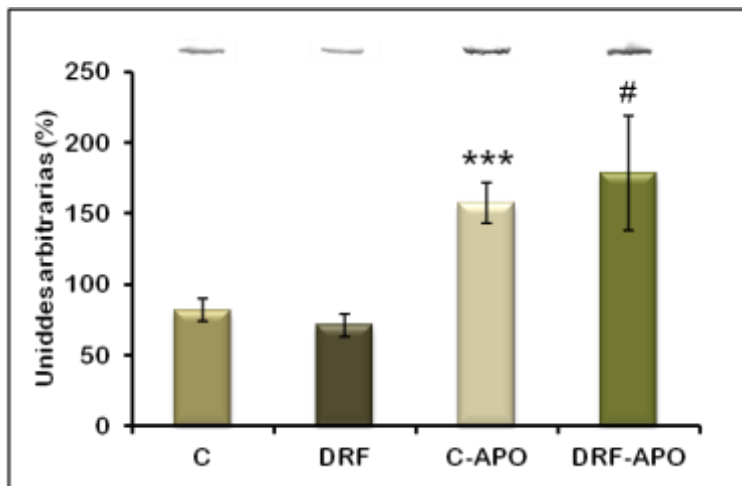


**Figura 19.** qPCR. En la figura se observan los promedios  $\pm$  EEM de 5 experimentos realizados por triplicado.

C vs DRF \*  $p < 0,02$ , C vs C-APO, DRF vs DRF-APO \*\*  $p < 0,001$

IV. 4. 5. 3. Catalasa

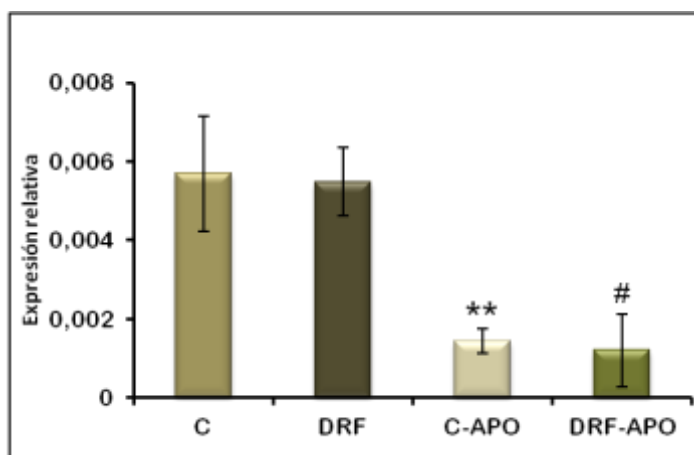
La expresión proteica de catalasa no presentó cambios significativos entre C y DRF. La apocinina aumentó la expresión significativamente en ambos grupos respecto al control (Figura 20).



**Figura 20.** Contenido de proteína para catalasa. Las barras representan los resultados obtenidos en el TAA en presencia del anticuerpo específico para esta enzima. En la parte superior se muestra el ejemplo de una corrida electroforética. Las barras representan la cuantificación realizada y corresponden al promedio  $\pm$  EEM de 5 experimentos.

C vs C-APO \*\*\*  $p < 0,005$ ; DRF vs DRF-APO #  $p < 0,01$

La expresión del gen que codifica para CAT se mantuvo sin cambios entre C y DRF, en cambio la apocinina disminuyó significativamente su expresión (Figura 21).

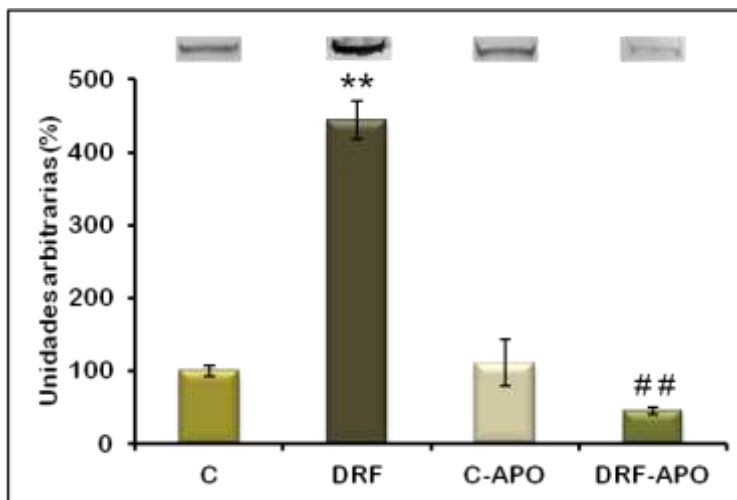


**Figura 21.** qPCR. En la figura se observan los promedios  $\pm$  EEM de 5 experimentos realizados por triplicado.

C vs C-APO \*\*  $p < 0,001$ ; DRF vs DRF-APO #  $p < 0,01$

**IV. 4. 5. 4. Glutación reductasa**

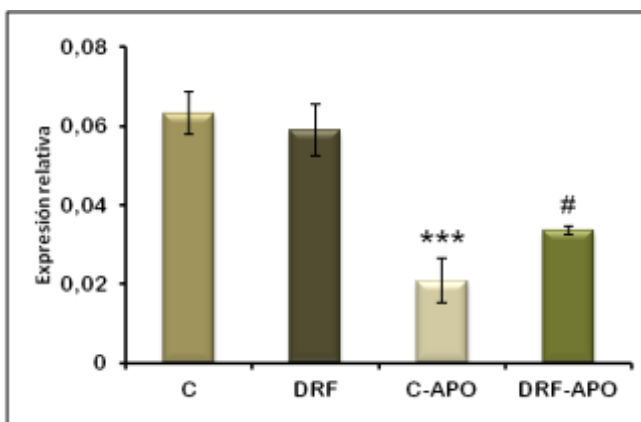
En esta proteína se encontró que el grupo DRF presentó un aumento altamente significativo con respecto a C retornando al valor control con apocinina. En el grupo DRF-APO la disminución fue aún mayor (Figura 22).



**Figura 22.** Contenido de proteína para glutatión reductasa. Las barras representan los resultados obtenidos en el TAA en presencia del anticuerpo específico para esta enzima. En la parte superior se muestra una corrida electroforética. Los datos representan el promedio ± EEM de 5 experimentos.

C vs DRF \*\* p< 0,001, DRF vs DRF-APO ## p< 0,05

La expresión del gen de glutatión reductasa no presentó cambios entre C y DRF, mientras que la apocinina disminuyó los valores por debajo del control (Figura 23).



**Figura 23.** qPCR. En la figura se observan los promedios ± EEM de 5 experimentos realizados por triplicado.

C vs C-APO \*\*\* p< 0,005; DRF vs DRF-APO # p< 0,01

#### IV. 5. Estudios dinámicos *in vitro*: incubación de TAA

##### IV. 5. 1. Liberación de ácidos grasos libres (NEFAs)

La liberación espontánea de AGL (NEFAs) al medio de incubación por el TAA obtenido de ratas DRF fue significativamente mayor que la de los animales C ( $12,30 \pm 0,27$  vs  $14,50 \pm 0,20$   $\mu\text{moles/L}$ ,  $p < 0,001$ ). La apocinina no modificó este valor en el TAA de ratas C mientras que en el de ratas DRF-APO la liberación disminuyó significativamente alcanzando los valores del lote C ( $11,3 \pm 0,39$ , NS;  $12,1 \pm 0,34$   $\mu\text{moles/L}$ ,  $p < 0,001$ ).

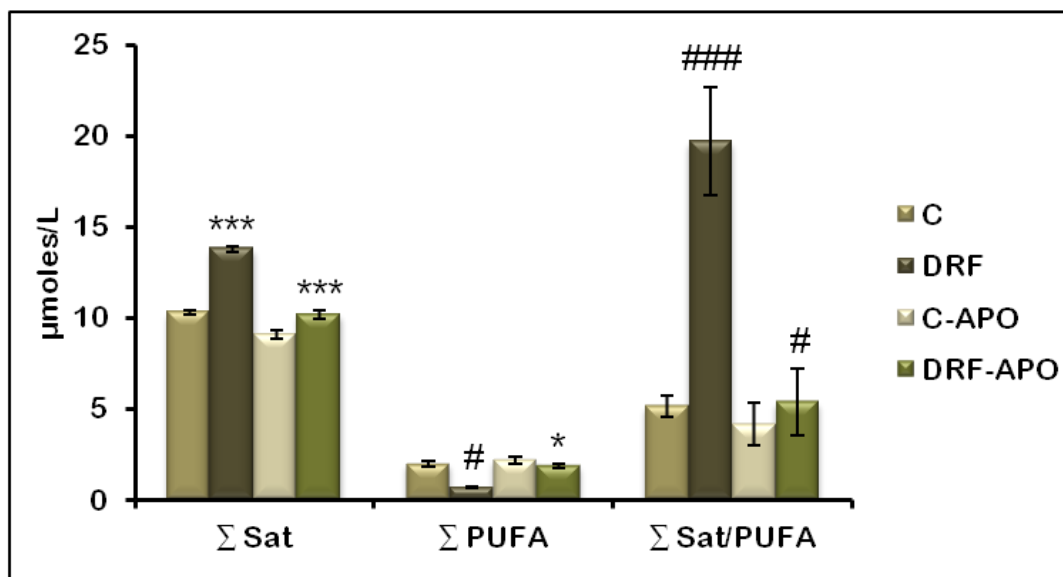
**Tabla 10.** Composición relativa de ácidos grasos liberados al medio de incubación

Ácido graso	C	DRF	C-APO	DRF-APO
14:0	< 0.10	< 0.10	$0,10 \pm 0,005$	$0,10 \pm 0,015$
16:0	$4,10 \pm 0,05$	$5,50 \pm 0,05^a$	$3,20 \pm 0,10$	$3,90 \pm 0,05$
16:1	< 0.10	< 0.10	< 0.10	$0,10 \pm 0,01$
18:0	$6,20 \pm 0,05$	$8,30 \pm 0,10^a$	$5,80 \pm 0,10$	$6,20 \pm 0,15$
18:1	< 0.10	< 0.10	$0,20 \pm 0,01$	$0,1 \pm 0,015$
18:2 n-6	$1,50 \pm 0,10$	$0,70 \pm 0,05^d$	$1,30 \pm 0,10$	$1,30 \pm 0,05$
18:3 n-3	$0,10 \pm 0,0015$	< 0.10	$0,10 \pm 0,005$	$0,10 \pm 0,02$
20:3 n-6	< 0.10	< 0.10	$0,10 \pm 0,015$	< 0.10
20:4 n-6	$0,20 \pm 0,05$	< 0.10	$0,30 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,015$
Otros PUFAs	$0,20 \pm 0,02$	< 0.10	$0,20 \pm 0,025$	$0,10 \pm 0,005$
$\Sigma$ Sat	$10,30 \pm 0,10$	$13,80 \pm 0,15^a$	$9,1 \pm 0,21$	$10,2 \pm 0,22^a$
$\Sigma$ PUFAs	$2,00 \pm 0,17$	$0,70 \pm 0,05^b$	$2,2 \pm 0,18$	$1,9 \pm 0,12^d$
$\Sigma\text{Sat}/\Sigma$ PUFAs	$5,15 \pm 0,59$	$19,70 \pm 3,00^c$	$4,14 \pm 1,17$	$5,37 \pm 1,83^b$

Los valores son expresados en  $\mu\text{moles/L}$  de medio y corresponden a 4 animales por grupo. Los resultados representan la media  $\pm$  EEM de 5 experimentos. C vs DRF <sup>a</sup>  $p < 0,005$ ; <sup>b</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>c</sup>  $p < 0,025$ ; DRF vs DRF-APO <sup>d</sup>  $p < 0,02$

Analizando la composición de la fracción de ácidos grasos (Tabla 10) en los animales DRF, se encontró una mayor proporción de ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) (16:0 y 18:0 respectivamente) con respecto a C ( $p < 0,005$ ), mientras que el ácido mirístico (14:0) prácticamente no fue detectable.

Por el contrario, en la fracción de ácidos grasos insaturados se observaron sólo trazas en la mayoría de ellos. Los componentes de la familia n-6 (18:2 y 20:4 como los más relevantes) disminuyeron significativamente en las ratas DRF respecto de C ( $p < 0,02$ ). En consecuencia, la cantidad total de PUFA liberados al medio fue significativamente menor en DRF que en C ( $p < 0,01$ ) y la relación de saturados/PUFA fue significativamente mayor. Notablemente el tratamiento con apocinina produjo una reversión completa de estas alteraciones (Figura 24).



**Figura 24.** Composición de ácidos grasos libres (NEFA) liberados por el TAA al medio de incubación. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de 5 experimentos.

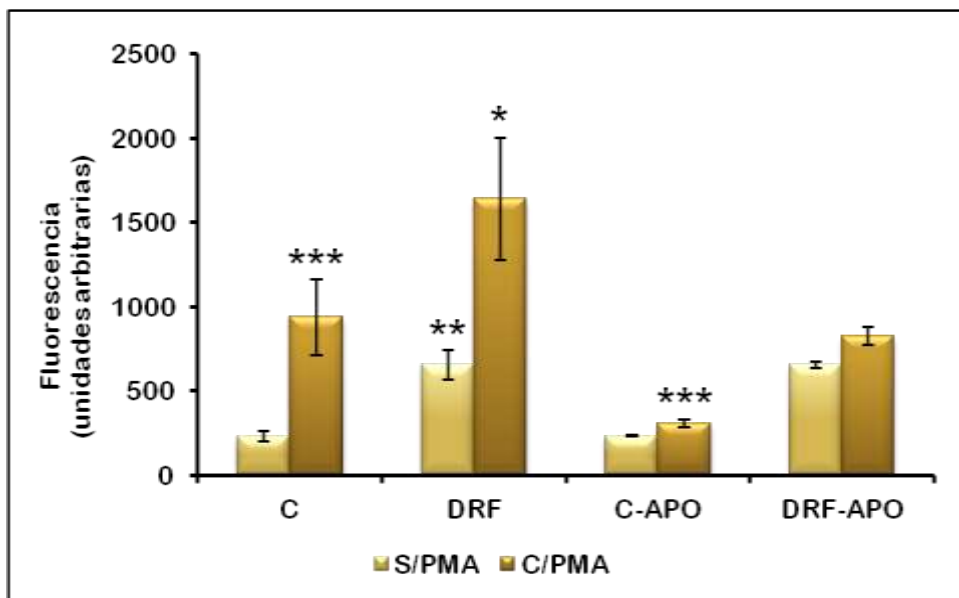
C vs DRF \*\*\*  $p < 0,005$ , #  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,025$ ; DRF vs DRF-APO \*\*\*  $p < 0,005$ , \*  $p < 0,02$ , #  $p < 0,01$

## IV. 5. 2. Producción *in situ* de especies reactivas del oxígeno (ROS) en adipocitos aislados de TAA

### IV. 5. 2. 1. Producción de ROS (método con diclorofluoresceína)

La producción de ROS en los adipocitos incubados con DCFA aumentó significativamente en el grupo DRF con respecto al grupo C ( $657,4 \pm 86,6$  *vs*  $234,3 \pm 29$ ) (Figura 25). El tratamiento con apocinina no modificó este parámetro con respecto al control.

Cuando los adipocitos se incubaron en presencia del éster de forbol (PMA), estimulador de la proteína quinasa C (PKC), se observó un aumento significativo de la cantidad de ROS tanto en C como en DRF ( $939,6 \pm 224$  *vs*  $1643,2 \pm 363,4$ ). El tratamiento con apocinina en presencia del PMA disminuyó la producción de ROS en ambos grupos (C-APO PMA  $306,7 \pm 22,2$  *vs* DRF-APO PMA  $826,4 \pm 55$ ) indicando un efecto protector del mismo.



**Figura 25:** Producción de ROS en presencia de DCFA. Los valores se expresaron como fluorescencia en unidades arbitrarias. Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM de 5 experimentos realizados por triplicado.

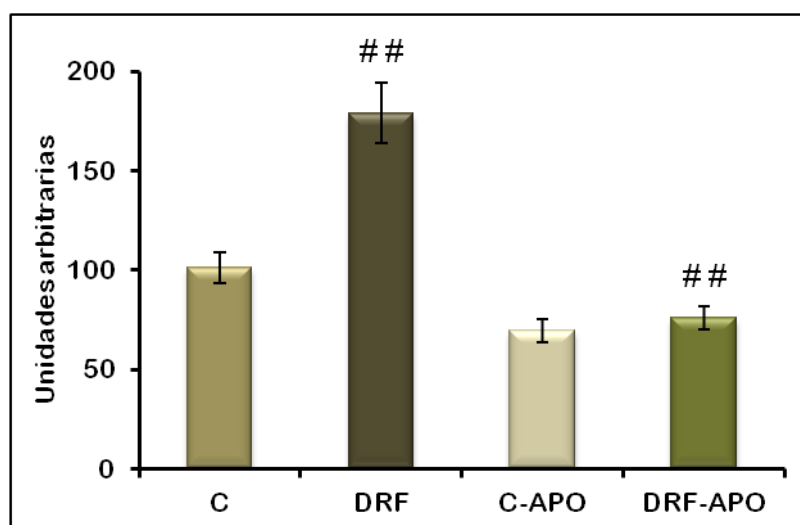
C *vs* DRF \*\*  $p < 0,001$ , C *vs* PMA, C-APO *vs* PMA \*\*\*  $p < 0,005$ , DRF *vs* PMA \*  $p < 0,02$

#### IV. 5. 2. 2. Producción de formazán como medida de la actividad de NADPH-oxidasa

En adipocitos aislados provenientes de TAA de animales DRF se observó un incremento significativo en la actividad de la enzima con relación al grupo C y también se encontró una disminución en el grupo tratado con apocinina.

En adipocitos incubados en presencia de un inhibidor de la enzima como el difeniliodonium (DPI), se pudo apreciar un efecto inhibitorio del compuesto en las ratas DRF-APO, no encontrándose diferencias significativas en adipocitos provenientes del grupo C.

Cuando se expresó el porcentaje de inhibición en presencia de DPI se observó que el grupo DRF presentó un porcentaje significativamente mayor que el grupo C y que el tratamiento con apocinina bajó la actividad al valor del C (Figura 26).



**Figura 26.** Las barras representan la diferencia de la producción de radical superóxido medido en presencia y ausencia de DPI. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias que indican la intensidad de la formación de formazán a partir del NBT por el radical superóxido.

C vs DRF, DRF vs DRF-APO ##  $p < 0,05$



#### IV. 6. Efecto de ácido $\alpha$ -lipoico sobre marcadores plasmáticos del dismetabolismo inducido por la dieta rica en fructosa

##### IV. 6. 1. Efecto de la dieta rica en fructosa sobre el peso corporal

Una vez establecido el estado de dismetabolismo en los animales tratados con fructosa durante 21 días - y habiendo observado cambios en presencia de un inhibidor de la NADPHoxidadasa como es la apocinina - se quiso estudiar el efecto de un antioxidante más ampliamente conocido y ampliamente utilizado a nivel clínico como lo es el ácido  $\alpha$  lipoico (AL) o tióctico.

Dado que este compuesto tiene efecto anorexígeno, en estos experimentos controlamos la posible variación de peso en todos los grupos. Los resultados obtenidos no demostraron diferencias significativas entre grupos (Tabla 11).

**Tabla 11.** Peso corporal

Peso (g)	C	DRF	C-AL	DRF-AL
Inicial	192,4 $\pm$ 1,7	190,4 $\pm$ 1,2	192,7 $\pm$ 2,2	193,7 $\pm$ 1,6
Final	282,4 $\pm$ 6,1	295,1 $\pm$ 4,8	277,5 $\pm$ 7,9	285,7 $\pm$ 4,6

El peso inicial y final se expresaron en gramos. Los resultados representan la media  $\pm$  el EEM de entre 10 y 30 animales por grupo.

##### IV. 6. 2. Marcadores plasmáticos del dismetabolismo inducido por la dieta rica en fructosa

Cuando se determinaron los parámetros séricos (Tabla 12), se observó que las alteraciones encontradas en los animales DRF fueron reestablecidas al valor control por el AL. Si bien los valores glucémicos no cambiaron en DRF, el tratamiento con AL disminuyó en el grupo C-AL. Los TG aumentaron en DRF, retornando a los valores de sus respectivos controles con el AL. Los niveles de

AGL se mantuvieron por debajo de los controles. Los TBARS del grupo DRF-AL se encontraron más bajos que en el grupo control. La adiponectina y leptina aumentaron en el grupo DRF pero luego del tratamiento sus valores disminuyeron en ambos grupos tratados. En la TGIP, el área bajo la curva de los animales DRF fue significativamente mayor, anomalía que fue corregida por el tratamiento con AL.

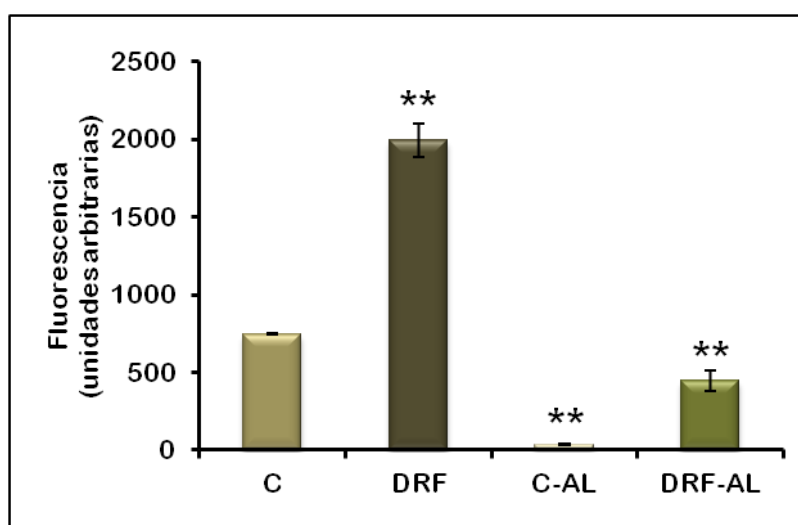
**Tabla 12.** Marcadores séricos.

Parámetro	C	DRF	C-AL	DRF-AL
<b>Glucosa</b> (mmol/L)	6,29 ± 0,09	6,30 ± 0,20	5,69 ± 0,15	6,06 ± 0,19
<b>Insulina</b> (μU/ml)	23,1 ± 3,44	43,9 ± 4,14 <sup>a</sup>	22,9 ± 3,44	28,7 ± 5,24 <sup>d</sup>
<b>HOMA - IR</b>	6,53 ± 0,99	12,3 ± 1,27 <sup>a</sup>	5,88 ± 0,91	7,96 ± 1,54 <sup>d</sup>
<b>NEFA</b> (mmol/L)	0,64 ± 0,07	0,68 ± 0,08	0,40 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,14
<b>Triglicéridos</b> (mmol/L)	0,87 ± 0,05	1,72 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,09	1,43 ± 0,13 <sup>b</sup>
<b>TBARS</b> (nmol/mg)	58,7 ± 4,45	73,7 ± 5,51 <sup>c</sup>	69,6 ± 14,0	46,5 ± 9,30 <sup>c</sup>
<b>Leptina</b> (ng/ml)	4,77 ± 0,35	6,67 ± 0,62 <sup>e</sup>	3,58 ± 0,46	3,68 ± 0,44 <sup>a</sup>
<b>Adiponectina</b> (μg/mL)	10,6 ± 0,68	14,1 ± 0,79 <sup>a</sup>	6,87 ± 0,58 <sup>a</sup>	7,89 ± 0,36 <sup>d</sup>
<b>TGIP</b> (mmol/L/min)	1,34 ± 0,15	2,25 ± 0,28 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,09	1,64 ± 0,18

C vs DRF, C vs C-AL y DRF vs DRF-AL: <sup>a</sup> p < 0,01; C vs DRF y DRF vs DRF-AL: <sup>b</sup> p < 0,001; DRF vs DRF-AL: <sup>c</sup> p < 0,05; DRF vs DRF-AL: <sup>d</sup> p < 0,005; C vs DRF: <sup>e</sup> p < 0,02.

### IV.6. 3. Producción de ROS en adipocitos

La producción de ROS aumentó en los animales DRF. El tratamiento con AL disminuyó significativamente los valores en ambos grupos tratados y en el grupo C-AL fueron prácticamente no detectables (Figura 27).



**Figura 27.** Producción de ROS con DCFA en adipocitos aislados.

Los valores se expresaron como fluorescencia en unidades arbitrarias. Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM de 2 experimentos realizados por triplicado. C *vs* DRF, C *vs* C-AL; DRF *vs* DRF-AL \*\*  $p < 0,001$

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se trató de demostrar que el estrés oxidativo inducido por la administración de DRF precede y es responsable de la disfunción endocrino-metabólica que acompaña a este tipo de dieta. También se buscó probar que la actividad de la NADPH-oxidasa juega un papel importante en la aparición del estrés oxidativo.

Para probar esta hipótesis, luego de demostrar la aparición de diferentes marcadores de estrés oxidativo y de la mencionada disfunción, verificamos el efecto de la coadministración de un inhibidor específico de NADPH-oxidasa (apocinina), (Cui C y col., 2007) y de un antioxidante (ácido  $\alpha$ -lipoico) (Bilska A & Wlodek L, 2005; Skibska B y col., 2006; Thrunavukkarasu V & Anuradha CV, 2004), que actúa sobre la producción de ROS tanto a nivel mitocondrial como extramitocondrial.

Los valores de glucemia en las ratas DRF fueron similares a los del grupo control pero con aumento de los niveles de fructosamina (marcador de glucosilación no enzimática de proteínas plasmáticas y sistémicas). Estas alteraciones estuvieron asociadas al aumento de los niveles plasmáticos de triglicéridos y de NEFA (indicadores de una disfunción metabólica del tejido adiposo) que coincidieron con los reportados previamente por nuestro grupo (Francini F y col., 2010; García M y col., 2010; Rebolledo O y col., 2008). El aumento registrado en los niveles plasmáticos de insulina y del índice HOMA-IR demostraron el estado de insulinoresistencia (Reaven G, 1988; Rebolledo O y col., 2008) y los de leptina la disfunción endocrina del tejido adiposo (Alzamendi A y col., 2009).

Estos resultados son también coincidentes con los publicados por varios autores que utilizaron modelos similares de manipulación alimentaria donde quedó probado que los animales alimentados con dietas ricas en hidratos de carbono simples, desarrollan rápidamente intolerancia a la glucosa (3-5 semanas), altos niveles de insulina, dislipemia y mayor secreción de insulina en respuesta a la glucosa. (Catena y col., 2003; Chicco A y col., 2003; Dai S y col., 1994; Del Zotto H y col., 2002; Gutman R y col., 1987; Lombardo Y y col., 1983; Lombardo Y y col., 1996 a y b; Massa ML y col., 2001; Nandhini A y col., 2005;

Pagliassotti MJ y col., 1996; Reaven GM, 1988; Storlien L y col., 1988; Thorburn AW y col., 1989).

Se han postulado distintas hipótesis sobre el mecanismo por el cual la fructosa produce estas alteraciones. En primer lugar, está demostrado que este tratamiento induce la aparición de estrés oxidativo (Faure P y col., 1997; Halliwell B, 1996; Mc Donald RB, 1995; Nandhini A y col., 2005), por lo que se ha propuesto que muchos de los cambios observados se deberían a los efectos prooxidantes de la propia fructosa que afectaría simultáneamente el metabolismo de lípidos y de hidratos de carbono (Dai S y col., 1994; Gutman R y col., 1987; Lombardo Y y col., 1983; Pagliassotti MJ y col., 1996; Storlien L y col., 1988).

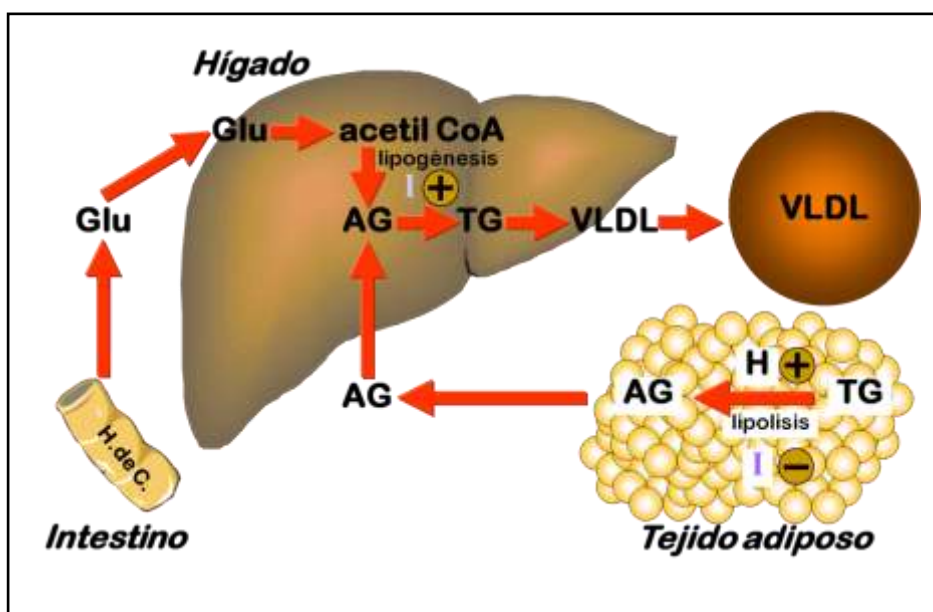
Por otra parte, en 1961, Ahrens y colaboradores postularon que en personas no obesas el consumo de una dieta con alto porcentaje de carbohidratos induce hipertrigliceridemia (Ahrens E y col., 1961). Luego otros autores confirmaron estos hallazgos tanto en humanos (Accini R y col., 2006; Mancini M y col., 1973) como en animales de experimentación (Bar-on H y Stein Y, 1968; Bar-on H y col., 1976; Chevalier MM y col., 1972; Eaton RP y Kipnis DM, 1969; Hill P, 1970; Nikkila EA y Ojala K, 1966; Reaven GM y col., 1979; Sleder J y col., 1980; Waddell M y Fallon HJ, 1973). En todos ellos, al igual que en nuestro caso, se encontraron valores de triglicéridos plasmáticos elevados. Hoy se sabe que esta alteración en la homeostasis lipídica es un factor clave para el desarrollo de insulinorresistencia y DMT2, ya que los depósitos de grasa fuera del tejido adiposo juegan un rol muy importante en la patogenia de la insulinorresistencia y en el daño de la célula  $\beta$  pancreática. Varios estudios mostraron una correlación significativa entre los depósitos de grasa en el músculo y el desarrollo de insulinorresistencia (Pan DA y col., 1997; Stein DT y col., 1997). Es por esta razón que actualmente se postula que la DMT2, que tradicionalmente se ha tratado como una alteración del metabolismo de carbohidratos, en realidad debería considerarse como un trastorno plurimetabólico asociado a un componente inflamatorio-degenerativo crónico y progresivo (Mc Garry J, 2002).

Los valores de leptina y TBARS también están indicando alteraciones metabólicas y de peroxidación lipídica en estos animales lo que estaría en apoyo

de la disfunción endócrina-metabólica del tejido adiposo y su rol en el modelo propuesto (Alzamendi A y col., 2009; Basciano H y col., 2005; Miatello R y col., 2005; Rebolledo O y col., 2008; Verma S y col., 1997).

El análisis de la composición de lípidos plasmáticos de los animales DRF mostró altos niveles circulantes de NEFA e hipertrigliceridemia, ambos marcadores de insulinoresistencia (Abel ED y col., 2001; Borden G, 1997; Grundy SM, 1999). El aumento de la biosíntesis hepática de ácidos grasos inducida por la DRF lleva al incremento de los triglicéridos de las VLDL (Actis Dato S, 2008; Julius U, 2003; Zavaroni y col., 1988) y a la disminución del colesterol de las HDL (Figura 28). Tanto la alteración en la composición como en la función de ambas lipoproteínas producen mayor riesgo aterogénico (Boizel R y col., 2000; Rabini y col., 1999). La disminución de las HDL en los animales DRF podría relacionarse con procesos interdependientes que son responsables de su biosíntesis y de su metabolización. La disminución de la hidrólisis de lipoproteínas ricas en triglicéridos se puede deber, sobre todo en los períodos postprandiales, a una disminución en la actividad de la lipoproteinlipasa, enzima presente en los endotelios vasculares y cuya actividad está disminuida en dietas ricas en fructosa (Picard y col., 2002). La disminución del colesterol de las HDL como de las LDL podrían deberse a un aumento de su transferencia a las VLDL y de triglicéridos en sentido inverso, aumentando así la síntesis de moléculas pequeñas de LDL con alto potencial aterogénico (Dallinga-Thie y col., 2007).

Si bien el tamaño de las partículas de lipoproteínas no fue medido, el aumento en la relación TG/C-HDL en DRF sugiere un incremento de las partículas plasmáticas de LDL pequeñas y densas en acuerdo con lo sugerido en trabajos previos (Boizel y col., 2000).



**Figura 28.** Síntesis hepática de VLDL. Extraído de Actis Dato SM, 2008.

Los cambios observados en la composición de ácidos grasos en las fracciones de HDL y en la de VLDL+LDL, caracterizados por un aumento significativo de los ácidos grasos saturados a expensas de los mono- y poliinsaturados, coinciden con un estado pro-oxidativo producido por la administración de DRF. Con anterioridad, otros autores han descrito cambios similares en los PUFAs y MUFAs de plasma, corazón, hígado y tejido adiposo abdominal de ratas tratadas con sacarosa y/o fructosa en modelos de diabetes tipo 1 y 2, e insulinoresistencia (Comte C y col., 2004; Girard A y col., 2005; Montanaro M y col., 2005; Rebolledo O y col., 2008). Podría aceptarse entonces, que la DRF induce alteraciones en el metabolismo lipídico e hidrocarbonado generando un perfil aterogénico temprano.

La administración de DRF provocó un claro aumento del estrés oxidativo demostrado por el incremento de los TBARS (biomarcador de peroxidación de lípidos), no sólo en el plasma sino también en el tejido adiposo abdominal. Esta alteración fue prevenida por la co-administración de apocinina, así como también por el tratamiento con ácido  $\alpha$ -lipoico.

La disfunción endocrina del tejido adiposo también quedó demostrada por el aumento de la expresión del gen de leptina, que concuerda con el aumento de sus niveles plasmáticos, así como también con la disminución en la expresión de los IRS-1 y 2. Estos resultados coinciden con estudios previos donde se describió un aumento en la liberación de leptina por el tejido adiposo abdominal de ratas tratadas con DRF asociado con el aumento del tamaño de los adipocitos. (Alzamendi A y col., 2009). Podría entonces asumirse que la excesiva producción de leptina (producto/causa de una leptinorresistencia), disminuiría quizás la respuesta a la insulina del tejido adiposo abdominal, afectando tanto la unión de la hormona a su receptor (Walder K y col., 1997) como la cascada de sus mediadores intracelulares (expresión de IRS-1 e IRS-2) (Cohen B y col., 1996; Krempler F y col., 1998). Todos estos resultados refuerzan el concepto que la disfunción del tejido adiposo abdominal desempeña un rol muy importante en la aparición de la múltiple disfunción metabólica y endócrina inducida por la DRF. La prevención de su desarrollo mediante la coadministración de apocinina y ácido  $\alpha$ -lipoico sugiere que el estrés oxidativo sería un elemento inicial en la secuencia de eventos que llevan a dicha disfunción, y se constituyen en importantes hitos con potencialidad clínica que deberían ser más intensamente investigados.

A nivel de la composición de los ácidos grasos del tejido adiposo abdominal, la administración de DRF durante 21 días provocó un aumento significativo de la cantidad de ácidos grasos saturados y una disminución en los mono- y poliinsaturados cambiando la relación entre ellos. En este sentido, el vínculo entre composición de ácidos grasos y sensibilidad a la insulina fue estudiado por Borkman y colaboradores demostrándose que la disminución de la sensibilidad a la insulina se asocia a concentraciones menores de PUFA en los fosfolípidos del músculo esquelético (Borkman M y col., 1993). Este hecho sugiere que los cambios en la composición de ácidos grasos de este tejido modulan la acción de la hormona. Lo anterior es asimismo coincidente con lo encontrado en el tejido adiposo (Rebolledo O y col., 2008).

En otro modelo de administración de dietas ricas en hidratos de carbono simples, Montanaro y colaboradores en el 2005 demostraron que la



administración de sacarosa durante 6 meses a ratas normales no modificó la actividad ni el contenido de ARNm de la desaturasa hepática, pero sí alteró la composición de los ácidos grasos plasmáticos y hepáticos (Montanaro M y col., 2005). Una explicación plausible para este hallazgo la constituye el suponer que la actividad de biosíntesis endógena de PUFAs en animales adultos es insignificante, por lo que el perfil de acilación de cadenas en los lípidos complejos estaría modulado por otros factores metabólicos tales como su captación, remodelado y tasa de excreción/oxidación. No obstante ello la biosíntesis de PUFAs de cadena larga y muy larga está regulada, en alguna medida, por las desaturasas microsomales  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$ , cuyas actividades están fuertemente afectadas por nutrientes y hormonas (Brenner R, 2003; Montanaro A y col., 2005). Se conoce fehacientemente que la insulina activa ambas enzimas (Brenner R, 2003). Se podría decir entonces que además de otros factores metabólicos aún no identificados la disminución de la sensibilidad a la insulina del tejido adiposo abdominal de los animales DRF podría ayudar a explicar el aumento de la relación  $\Sigma \text{Sat}/\Sigma \text{PUFA}$ . Por otra parte, está demostrado que el estrés oxidativo presente en ratas DRF provoca una disminución de la masa de células  $\beta$  debido al aumento de apoptosis, hecho que sumado a la insulinoresistencia contribuiría a la disminución de la actividad biológica de la insulina (Maiztegui y col., 2011).

Si bien no hay una evidencia clara de que el estrés oxidativo modifica la actividad de las desaturasas del tejido adiposo abdominal, los cambios ya mencionados registrados en los cocientes sugieren un bloqueo en la utilización del ácido linoleico por la vía metabólica n-6 que lleva a la biosíntesis de araquidonato. El estrés oxidativo podría favorecer selectivamente la destrucción de ciertos PUFAs y así indirectamente disminuir su bioconversión a través de las actividades  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturantes. Adicionalmente y aunque no sabemos con certeza cómo el estrés oxidativo altera el complejo espectro de *relaciones* entre miembros de las series esenciales n-6 y n-3, la conocida diferente sensibilidad que ambas series tienen frente al estrés oxidativo, podría cambiar la tasa de conversión de los precursores en sus homólogos superiores. A todos estos factores debemos agregar el *enriquecimiento* relativo que el estrés oxidativo

desencadena sobre los ácidos grasos saturados ya que ellos no son sensibles a la fractura de cadena inducida por radicales libres.

Observamos también que la coadministración de DRF con apocinina previno efectivamente todos los cambios inducidos por la DRF.

El estrés oxidativo producido por un aporte excesivo de fructosa se podría atribuir a varios mecanismos. A saber: daño en el sistema antioxidante celular, aumento en la producción de ROS, autooxidación de glucosa (Wolff S, Dean R, 1987), glicosilación no enzimática y oxidativa (glicoxidación) (Brownlee M, 2000; Lyons T, Jenkins A, 1997) y consecuente oxidación de lípidos. En los animales DRF, se evidenció un aumento de la actividad del sistema de las enzimas antioxidantes, acompañado por una disminución de los antioxidantes lipo- e hidrosolubles no enzimáticos ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -carotenos, retinol, licopenos y GSH). Parte de nuestros resultados son coincidentes con los de otros autores quienes publicaron también una disminución de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en riñón y corazón de ratas tratadas con fructosa durante 30 días (Nandhini A., 2005).

En relación a la expresión proteica y génica de las enzimas antioxidantes no se encontraron diferencias significativas entre C y DRF. Por el contrario se observó un aumento significativo en la actividad y expresión proteica de la GSH-R en los animales DRF. Dicho incremento podría indicar la existencia de un mecanismo compensatorio para reducir el glutatión oxidado (GSSG) formado por el estrés oxidativo. De esta forma se regeneraría el glutatión reducido, considerado el más efectivo antioxidante hidrosoluble del citosol (Rebolledo OR y col., 2008). También se observó que la apocinina produjo una sobreexpresión de la proteína de SOD-1, SOD-2 y catalasa, en cambio mantuvo el valor de los controles para esta enzima.

Los resultados de la expresión de genes fueron similares a los encontrados con las proteínas, salvo que la apocinina tuvo efectos variables.

El tejido adiposo abdominal liberó mayor cantidad de NEFA en los animales DRF, sugiriendo una mayor actividad de la lipasa. El tejido adiposo es la principal fuente de provisión de ácidos grasos al hepatocito (Reddy J y Rao M, 2006), de modo que el aumento de los NEFAs junto con el estado de insulinoresistencia

desarrollado en estos animales creemos que desempeñaría un papel importante en el desarrollo de la esteatosis hepática, idea coincidente con trabajos previos de Ackerman Z y col. (2005).

Si se tiene en cuenta el efecto antilipolítico de la insulina se podría decir entonces, que el aumento en la liberación de ácidos grasos encontrado en los animales DRF se debería al estado de insulinoresistencia del tejido adiposo abdominal en estos animales. Estos datos concuerdan con otros obtenidos en humanos y también con los provenientes de modelos de animales alimentados con dietas ricas en sacarosa o fructosa durante tiempos variables (Smith U y col., 1973; Soria A y col., 2001; Vrána A y col., 1974).

Los cambios en la composición de los ácidos grasos liberados al medio concuerdan con los encontrados en el tejido adiposo de los animales C y DRF. Resultados similares fueron descritos por Girard y colaboradores en la composición de ácidos grasos de VLDL – LDL de ratas SHR alimentadas con fructosa durante 8 semanas (Girard A y col., 2005).

La elevada producción de ROS en las ratas DRF demostró el aumento del estrés oxidativo en el tejido adiposo de estos animales. Este proceso daría lugar simultáneamente a varias disfunciones: la disminución del sistema de defensa antioxidante no enzimático, la disminución de la sensibilidad a la insulina, un aumento de los niveles de leptina, una mayor liberación de ácidos grasos y una elevación significativa de la relación  $\Sigma\text{Sat} / \Sigma\text{PUFA}$  que ya fuera reportada en un trabajo previo por nuestro grupo (Rebolledo O y col., 2008).

El aumento de NEFAs circulantes estimularía a la NADPH-oxidasa (Furukawa S y col., 2004), estableciendo un mecanismo de retroalimentación positiva que mantendría una mayor producción de ROS. El tratamiento durante 21 días con fructosa provocó, a nivel del tejido adiposo un aumento de la actividad de la NADPH-oxidasa con incremento paralelo de los niveles de TBARS plasmáticos y de la producción de ROS. La coadministración de la DRF con apocinina previno de manera significativa todas estas alteraciones.

Recientemente, Curtis y colaboradores sugirieron que la carbonilación de proteínas juega un rol muy importante en la disfunción de la mitocondria y esto

podría estar relacionado con la insulinoresistencia del tejido adiposo abdominal, por lo que el estrés oxidativo y la insulinoresistencia podrían retroalimentarse positivamente en los animales DRF (Curtis J y col., 2012).

Respecto al mecanismo molecular por el que el estrés oxidativo afectaría la sensibilidad a la insulina, se observó que en individuos obesos con insulinoresistencia presentan un significativo aumento de estrés oxidativo y simultáneamente disminución de la actividad de AMPK en comparación con pacientes también obesos pero sensibles a la insulina (Xu X y col., 2012). Además, los altos niveles de ROS en el tejido adiposo abdominal, los ácidos grasos libres plasmáticos, el factor nuclear kappa  $\beta$  (NF-  $\kappa\beta$ ), junto con otros factores de transcripción pro-inflamatorios (Alam S y col., 2012), acelerarían el proceso de transición de la tolerancia de glucosa alterada al de DM2 en ratas tratadas en forma crónica con una dieta enriquecida en hidratos de carbono (Gutman R y col., 1987).

Coincidiendo con lo observado con la coadministración de apocinina, en el estudio complementario realizado coadministrando simultáneamente a los animales C y DRF con ácido  $\alpha$ -lipoico, se observó que todos los cambios que produjo la DRF fueron prevenidos por el ácido  $\alpha$ -lipoico. Cuando se estudió la producción de ROS del tejido adiposo abdominal de estos animales, se observó que el tratamiento con ácido  $\alpha$ -lipoico los disminuyó a valores casi no detectables. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Jacob y col. (1996) quienes demostraron que el tratamiento con ácido  $\alpha$ -lipoico durante 10 días (100mg/k) implementado en ratas Zucker (obesas), disminuyó los niveles séricos de insulina y triglicéridos. Otros autores describieron una disminución de estos parámetros de manera dosis-dependiente suministrando 1 a 5g/k de ácido  $\alpha$ -lipoico a ratas normales (Huong D e Ide T, 2008). Igualmente Thrunavukkarasu V y col. (2004) observaron que la administración simultánea de fructosa (61%) y ácido  $\alpha$ -lipoico (35 o 70 mg/k) a ratas normales durante 20 días modificó la sensibilidad a la insulina demostrada por el aumento en los niveles de glucemia, de insulinemia, de triglicéridos y del HOMA-IR. La administración de ácido  $\alpha$ -

lipoico disminuyó todos esos parámetros indicando un mejoramiento de la respuesta metabólica a la insulina (Deiuliis, J.A. y col., 2011).

Cummings B y colaboradores (2010) demostraron que la DRF acelera la aparición de diabetes en un modelo de ratas derivadas del cruzamiento de Sprague-Dawley obesas con Zucker delgadas (UCD-T2DM), efecto que fue retrasado por el tratamiento con ácido  $\alpha$ -lipoico.

Creemos que nuestros resultados descriptos apoyan la verosimilitud de la secuencia de eventos propuesta para explicar las múltiples disfunciones inducidas por la administración de DRF a ratas normales, al menos en nuestro modelo experimental. En síntesis, el estrés oxidativo sería el elemento inicial de dichos cambios, seguido por la disfunción metabólica y endócrina del tejido adiposo abdominal. Estos cambios también afectarían otros órganos como lo demostró nuestro grupo (Alzamendi A y col., 2009; Francini F y col., 2010; García M y col., 2010; Rebolledo O y col., 2008; Rebolledo A y col., 2010). El aumento de la actividad de la NADPH-oxidasa del tejido adiposo abdominal y también de otros órganos (Castro MC y col., 2012), jugaría un papel importante en la aparición del estrés oxidativo aunque también participaría el aumento de la producción mitocondrial de radicales libres. El hecho de poder prevenir estos procesos mediante la administración de un agente antioxidante plurivalente como lo es el lipoato y/o de fármacos que disminuyan la producción de un estado prooxidativo (apocinina), brinda una oportunidad valiosa para implementar su utilización en el control y tratamiento de la tolerancia a la glucosa alterada y disminuir la velocidad de su transición hacia la diabetes tipo 2.

El aporte incrementado de un hidrato de carbono simple como la fructosa durante un período de 3 semanas produjo los siguientes cambios:

- Aumento de los niveles plasmáticos de distintos marcadores de estrés oxidativo, metabólicos y endocrinos, tales como triglicéridos, insulina, fructosamina, tolerancia a la glucosa intraperitoneal, leptina e índice HOMA-IR demostrando una disfunción plurimetabólica-endocrina de alcance sistémico.
- Aumento en los ácidos grasos libres plasmáticos, acompañado de cambios en la composición lipídica de las lipoproteínas (HDL, VLDL+ LDL) y también de la relación entre ácidos grasos saturados e insaturados, indicando un estado prooxidativo y un temprano perfil lipoproteico aterogénico.
- Aumento de los TBARS y ROS en el tejido adiposo abdominal (indicadores de peroxidación de lípidos), confirmando que las alteraciones plasmáticas tienen una correlación con lo que sucede en el tejido adiposo. Concomitantemente, el aumento de AGL circulantes que estimula la actividad de la NADPH-oxidasa, contribuiría al aumento de la producción/acumulación de ROS y favorecería el desarrollo de un círculo vicioso de retroalimentación positiva AGL-ROS.
- Cambios en la expresión génica, concentración proteica y actividad de enzimas relacionadas con la capacidad antioxidante del tejido adiposo abdominal.
- Aumento de la actividad del sistema antioxidante enzimático junto con una disminución de los antioxidantes no enzimáticos como un fenómeno de respuesta adaptativa al aumento de ROS.
- Cambio en la composición de AG del tejido adiposo abdominal con incremento de la proporción de ácidos grasos saturados a expensas de los mono y poliinsaturados, demostrativo de la disfunción del metabolismo lipídico inducido en el tejido adiposo por la suplementación con fructosa.

- Efecto preventivo de la co-administración de un antioxidante como el ácido  $\alpha$ -lipoico, que regularizó las alteraciones plasmáticas y del tejido adiposo inducidas por la DRF.

Todas estas alteraciones inducidas por el aumento del consumo de fructosa durante un período de 3 semanas, se previnieron con la administración de apocinina. Este hecho sugiere la posibilidad de su uso potencial como herramienta terapéutica para prevenir la progresión desde la tolerancia a la glucosa alterada a la DMT2. Por otra parte, indican que es recomendable el consumo de una dieta con un balance adecuado de azúcares simples para evitar o retrasar el desarrollo de un cuadro de insulinoresistencia periférica. La evidencia experimental aquí reunida debería sustentar las recomendaciones dietéticas/nutricionales que se hagan llegar mediante protocolos *ad-hoc* a la población general.

- Abel ED, Peroni O, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman G, Kahn BB. (2001). Adipose-selective targeting of Glut4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409: 729 -733.
  
- Accinni R, Rosina M, Bamonti F, Della Noce C, Tonini A, Bernacchi F, Campolo J, Caruso R, Novembrino C, Gherzi L, Lonati S, Grossi S, Ippolito S, Lorenzano E, Ciani A, Gorini M. (2006) Effects of combined dietary supplementation on oxidative and inflammatory status in dyslipidemic subjects. *Nutr. Metab. Cardiovas. Dis.* 16: 121-127.
  
- Ackerman Z, Oron-Herman M, Pappo O, Link G, Sela BA. (2005). Fructose induced fatty liver disease. Hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension* 45: 1012 – 1018.
  
- Actis Dato SM. (2008). Diagnóstico y seguimiento de la dislipemia diabética. *Fisiopatología Endocrina: Bioq. Y Mét. Diagnósticos* 16 (10): 63 -76.
  
- Ahrens EH Jr, Hirsch J, Oette K, Farquhar JW, Stein Y. (1961). Carbohydrate-induced and fat-induced lipemia. *Trans Assoc Am Physicians* 74: 134 -146.
  
- Alam SE, Singh RB, Gupta S, Dherange P, De Meester F, Wilczynska A, Dharwadkar S, Wilson D, Hungin P. (2012) Nutritional aspects of epigenetic inheritance. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90: 989 – 994.
  
- Alzamendi A, Giovambattista A, Raschia A, Madrid V, Gaillard RC, Rebolledo O, Gagliardino JJ and Spinedi E. (2009). Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats. *Endocrine* 35, 227- 232.
  
- Araujo EP, Amaral ME, Filiputti E, De Souza CT, Laurito TI, Augusto VD, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA, Carneiro EM. (2004). Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate IRS-1 and IRS-2. *J. Endocrinol.* 181: 25-38.



- Argente J, Martos-Moreno GA, Hernández M. (2006). Mesa redonda: El tejido adiposo como glándula endocrina. *Obesidad y síndrome metabólico. Bol. Pediatr.* 46: 269-274.
- Asensi M, Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Estrella JM, y Viña J. (1994). A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal. Biochem.* 217: 323-328.
- Bagnati M, Bordone R, Perugini C, Cau C, Albano E, Bellomo G. (1998). Cu(I) availability paradoxically antagonizes antioxidant consumption and lipid peroxidation during the initiation phase of copper-induced LDL oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 235-240.
- Banerjee RR, Lazar MA. (2003). Resistin: molecular history and prognosis. *J. Mol. Med.* 81: 218-226.
- Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE, Stepan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. (2004). Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303: 1195-1198.
- Bar-On H & Stein Y. (1968). Effect of glucose and fructose administration on lipid metabolism in the rat. *J. Nutr.* 94: 95-105.
- Bar-On H, Roheim PS, Eder HA. (1976). Hyperlipoproteinemia in streptozotocin-treated rats. *Diabetes* 25: 509-515.
- Basciano H, Federico L and Adeli K. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr. Metab. (Lond.)* 2- 5.
- Bellomo A, Mancinella M, Troisi G, Ettore E, Marigliano V. (2007). Diabetes and metabolic syndrome (MS). *Arch Gerontol Geriatr* 44( Suppl 1):61- 67A.

- Bergman RN, Kim SP, Hsu IR, Catalano KJ, Chiu JD, Kabir M, Richey JM, Ader M. (2007). Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk. *Am. J. Med.* 120: S3 - S8.
- Betteridge D. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism* 49: 3 - 8.
- Bezerra RM, Ueno M, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CR, Saad MJ. (2000). A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J. Nutr.* 130:1531-1535.
- Bilska, A., Włodek, L. (2005). Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol Rep.* 57, 570-577.
- Bjorbaek C, Kahn BB. (2004). Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog. Horm. Res.* 59: 305-331.
- Boizel R, Benhamou PY, Lardy B, Laporte F, Foulon T, Halimi S. (2000). Ratio of triglycerides to HDL cholesterol is an indicator of LDL particle size in patients with type 2 diabetes and normal HDL cholesterol levels. *Diabetes Care* 23: 1679 -1685.
- Borden G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46: 3 -10.
- Borkman M, Storlien LH, Pan, DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV. (1993). The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. *N. Engl. J. Med.* 328: 238 – 244.
- Brenner RR. (2003) Hormonal modulation of delta6 and delta5 desaturases: case of diabetes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 68: 151-162.
- Brownlee M. (2000). Negative consequences of glycation. *Metabolism* 49: 9 – 13.
- Brownlee MJ. (2003). A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. *Clin. Invest.* 112:1831-1842.

- Busserolles J, Zimowska W, Rock E, Rayssiguier Y, Mazur A. (2002). Rats fed a high sucrose diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression. *Life Sci.* 71:1303 -1312.
- Buttriss JL, Diplock AT. (1984). High-performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues. *Methods Enzymol.* 105, 131-138.
- Carey RM, Siragy EHM. (2003). Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr. Rev.* 24:261- 271.
- Carlberg I, Mannervick B. (1985). Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113: 484 - 490.
- Castro MC, Francini F, Schinella G, Caldiz CI, Zubirías MG, Gagliardino JJ, Massa ML. (2012). Apocynin administration prevents the changes induced by fructose-rich diet on rat liver metabolism and the antioxidant system. *Clinical Science* 123: 681-692.
- Catena C, Giacchetti G, Novello M, Colussi G, Cavarape A, Sechi LA. (2003). Cellular mechanisms of insulin resistance in rats with fructose-induced hypertension. *Am J Hypertens* 16:973 - 978.
- Chevalier MM, Wiley JH, Leveille GA. (1972). Effect of dietary fructose on fatty acids synthesis in adipose tissue and liver of the rats. *J. Nutr.* 102: 337- 342.
- Chicco A, D'Alessandro ME, Karabatas L, Pastorale C, Basabe JC, Lombardo Y. (2003). Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *J. Nutr.* 133: 127-133.
- Chomczynski P and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156 -159.

- Cohen B, Novick D, Rubinstein M. (1996). Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274: 1185 -1188.
  
- Comte C, Bellenger J, Tessier C, Poisson JP, Narce M. (2004). Effects of streptozotocin and dietary fructose on delta-6 desaturation in spontaneously hypertensive rat liver. *Biochimie* 86: 799 - 806.
  
- Cui C, Chen,AF, Jiang Z, Wu Q, Lin J, Wen H and Zeng J. (2007). Inhibition of NAD(P)H oxidase reduces fibronectin expression in stroke-prone renovascular hypertensive rat brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*34, 304 - 309.
  
- Cummings BP, Stanhope KL, Graham JL, Evans JL, Baskin DG, Griffen SC, Havel PJ. (2010). 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.* 298: R1343 – R1350.
  
- Curtis JM, Hahn WS, Stone MD, Inda JJ, Drouillard DJ, Kuzmicic JP, Donoghue MA, Long EK, Armien AG, Lavandero S, Arriaga E, Griffin TJ Bernlohr DA. (2012) Protein carbonylation and adipocyte mitochondria function. *J. Biol. Chem.* 287: 32967-32980.
  
- Czajka-Narins D. Minerales. En: Mahan K, Escott S, Stump MR. (1998). ed. *Nutrición y Dietoterapia* de Krause. Ciudad de México: Editorial Mc Graw Hill 109 -128.
  
- Dai S, Todd ME, Lee S, Mc Neill JH. (1994). Fructose loading induces cardiovascular metabolic changes in nondiabetic and diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72:771-781.
  
- Dallinga-Thie GM, Dullaart RP, van Tol A. (2007). Concerted actions of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein in type 2 diabetes: effect of apolipoproteins. *Curr. Opin Lipidol.* 18: 251- 257.

- De Luca C and Olefsky JM. (2008). Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.* 582: 97-105.
- Dean P Jones and Young-Mi Go. (2010). Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes Obes. Metab.* 12 (suppl 2): 116 -125.
- Deilulis, J.A., Kampfrath, T., Ying, Z., Maiseyeu, A., Rajagopalan, S. (2011). Lipoic acid attenuates innate immune infiltration and activation in the visceral adipose tissue of obese insulin resistant mice. *Lipids.* 46, 1021-1032.
- Del Zotto H, Gómez Dumm CL, Drago S, Fortino A, Gagliardino JJ. (2002). Mechanism involved in the  $\beta$ -cell mass increase induced by chronic sucrose feeding to normal rats. *J. Endocrinol.* 174: 225 - 231.
- Duncombe WG. (1963). The colorimetric micro-determination of long-chain fatty acids. *Biochem. J.* 88 (1): 7-10.
- Eaton RP & Kipnis DM. (1969). Effect of glucose feeding on lipoprotein synthesis in rat. *Am. J. Physiol.* 217: 1153 -1159.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet* 365: 1415 -1428.
- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. (2004). Comparison of the release of adipokine by adipose tissue, adipose tissue matrix and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145: 2273-2282.
- Fall CH. (2001). Non-industrialized countries and affluence. *Br. Med. Bull.* 60:33 - 50.
- Faure P, Rossini E, Lafond JI, Richard MJ, Favier A, Halimi S. (1997). Vitamin E improves the free radicals defence system potential and sensitivity of rats fed high fructose diet. *J. Nutrition* 127: 103 -107.

- Ferrante D, Linetzky B, Konfino J, King A, Virgolini M, Laspiur S. Encuesta Nacional de Factores de Riesgo 2009: evolución de la epidemia de enfermedades crónicas no transmisibles en Argentina. Estudio de corte transversal. (2011). *Rev. Argent. Salud Pública* 2(6):34 - 41.
  
- Ferrante D, Virgolini M. Encuesta Nacional de Factores de Riesgo 2005: resultados principales. Prevalencia de factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares en la Argentina. (2007). *Rev. Argent. Cardiol.* 75(1) . Versión On-line ISSN 1850 - 3748.
  
- Flohé L, Ötting F. (1984). Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.* 105: 93 -104.
  
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497- 509.
  
- Francini F, Castro MC, Schinella G, García ME, Maiztegui B, Raschia MA, Gagliardino JJ, Massa ML. (2010). Changes induced by fructose-rich diet on hepatic metabolism and the antioxidant system. *Life Sciences* 86: 965-971.
  
- Friedman JM. (2002). The function of leptin in nutrition, weight and physiology. *Nutr. Rev.* 60: S1-S14
  
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114:1752-1761.
  
- García ME, Marra CA, Rebolledo OR. (2010). Glycosidative stress-induced damage on lipid profile in a fructose-enriched diet model of insulin resistance in rats. *Archives of Physiology and Biochemistry* 116: 42-49.
  
- Giovambatista A, Chisari AN, Gaillard E, Spinedi E. (2000). Food intake-induced leptin secretion modulates hypothalamo-pituitary-adrenal axis response

and hypothalamic Ob-Rb expression to insulin administration. *Neuroendocrinology* 72: (6), 341- 349.

- Girard A, Madami S, El Boustani ES, Belleville J, Prost J.(2005). 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* 21: 240 - 248.

- Grankvist K, Marklund SI, Taljedal IB. (1981). CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem. J.* 199:393 - 398.

- Griendling KK. (2006). NAD(P)H oxidases: new regulators of old functions. *Antioxid. Redox Signal* 8 (9-10): 1443 -1445.

- Grundy SM. (1999). Hypertriglyceridemia, insulin resistance and the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol.* 83: F25 - 29.

- Gutman RA, Basilico MZ, Bernal C, Chicco A, Lombardo YB. (1987). Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose-rich diet. *Metabolism* 36:1013 -1020.

- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. (1984). Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130 -7139.

- Hainault I, Nebout G, Turban S, Ardouin B, Ferre P, Quignard-Boulange A. (2002). Adipose tissue-specific increase in angiotensinogen expression and secretion in the obese (fa/fa) Zucker rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282:E59 – 66.

- Halaas J. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-546.

- Halliwell B. (1996). Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidants intake in humans. *Free Radicals Research* 25: 57-74.
- Harris RBS and Kor H. (1992). Insulin sensitivity is rapidly reversed in rats by reducing dietary fat from 40% to 30% of energy. *J. Nutr.* 22: 1811-1822.
- Herbert V, Lau KS, Gottlieb CW, Bleichert SJ. (1965). Coated charcoal immunoassay of insulin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 25: 1375 -138.
- Hill P. (1970). Effect of fructose on rat lipids. *Lipids* 5: 621- 627.
- Huong DT, Ide T. (2008). Dietary lipoic acid-dependent changes in the activity and mRNA levels of hepatic lipogenic enzymes in rats. *Br. J. Nutr.* 100: 79 – 87.
- Itaya K, Ui M. (1965). Colorimetric determination of free fatty acids in biological fluids. *J. Lipid Res.* 6: 16 - 20.
- Jacob S, Streeper RS, Fogt DL, Hokama JY, Tritschler HJ, Dietze GJ, Henriksen EJ. (1996). The antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid enhances insulin-stimulated glucose metabolism in insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes* 45: 1024 – 1029.
- Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. (1983). Fructosamine: A new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin. Chim. Acta* 127: 87- 95.
- Julius U. (2003). Influence of plasma free fatty acids on lipoprotein synthesis and diabetic dislipemia. *Exp. Clin. Endocr. Diabetes* 111: 246 - 250.
- Kahn BB and Flier JS. (2000). Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106: 473 - 48.



- Kamari Y, Grossman E, Oron-Herman M, Peleg E, Shabtay Z, Shamiss A, Sharabi Y. (2007). Metabolic stress with high carbohydrate diet increases adiponectin levels. *Horm. Metab. Res.* 39: 384 - 388
  
- Kershaw EE and Flier JS. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clin. Endocrinol & Metab.* 89 (6): 2548 - 2556.
  
- Klannemark M, Orho M, Langin D, Laurell H, Holm C, Reynisdottir S, Arner P, Groop L. (1998). The putative role of the hormone-sensitive lipase gene in the pathogenesis of type II diabetes mellitus and abdominal obesity. *Diabetologia* 41: 1516 -1522.
  
- Kraemer FB and Shen WJ. (2002). Hormone-sensitive-lipase: control of intracellular tri-(di-) acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J. Lipid Res.* 43: 1585 -1594.
  
- Krempler F, Hell E, Winkler C, Breban D, Patsch W. (1998). Plasma leptin levels: interaction of obesity with a common variant of insulin receptor substrate-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 1686 -1690.
  
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 - 685.
  
- Linde S, Hansen B, Lermark A. (1980). Stable iodinated polypeptide hormones prepared by polyadrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 107: 165-176.
  
- Lombardo YB, Chicco A, D'Alessandro ME, Martinelli M, Soria A, Gutman R. (1996) a. Dietary fish oil normalize dislipidemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet. *Biochem. Biophys. Acta*, 1299: 175 -182.
  
- Lombardo YB, Chicco A, Mocchiutti N, De Rodi MA, Nusimovich B, Gutman R. (1983). Effect of sucrose diet on insulin secretion in vivo and in vitro and on

triglyceride storage and mobilisation of the heart of rats. *Horm Metab Res.* 15(2): 69 -76.

- Lombardo YB, Drago S, Chicco A, Fainstein-Day P, Gutman R, Gagliardino JJ, Gomez Dumm CL. (1996) b. Long-term administration of sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. *Metabolism* 45: 1527-1532.

- Lyons TJ, Jenkins AJ. (1997). Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of the complications of diabetes: a carbonyl stress hypothesis. *Diabetes Rev.* 5: 365 – 391.

- Magocsi M, Yamaki M, Penniston JT and Dousa TP. (1992). Localization of mRNAs coding for isozymes of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase pump in rat kidney. *A. J. Physiol.* 263: F7- F14, (Renal Fluid Electrode Physiol. 32) etc.

- Maiztegui B, Borelli MI, Madrid VG, Del Zotto H, Raschia MA, Francini F, Massa ML, Flores LE, Rebolledo OR, Gagliardino JJ. (2011). Sitagliptin prevents the development of metabolic and hormonal disturbances, increased  $\beta$ -cell apoptosis and liver steatosis induced by a fructose-rich diet in normal rats. *Clin. Sci. (Lond.)* 120: 73-80.

- Mancini M, Mattock M, Rabaya E, Chait A, Lewis B. (1973). Studies of the mechanism of carbohydrate induced lipemia in normal man. *Atherosclerosis* 17: 445 - 454.

- Marrachelli VG., Miranda FJ, Alabadí JA, Lloréns S, Alborch E. (2006). Contribution of endothelin receptors and cyclooxygenase-derivatives to the altered response of the rabbit renal artery to endothelin-1 in diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 534: 178 -186.

- Marroquí L, Gonzalez A, Neco P, Caballero-Garrido E, Vieira E, Ripoll C, Nadal A, Quesada I. (2012). Role of leptin in the pancreatic  $\beta$ -cell: effects and signaling pathways. *Journal of Molecular Endocrinology* 49: R9 - R17.

- Massa MI, Borelli MI, Del Zotto H, Gagliardino JJ. (2001). Changes induced by sucrose administration on glucose metabolism in pancreatic islets in normal hamsters. *J. Endocrinol.* 171:551- 556.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function for fasting plasma and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-
- Mc Donald RB. (1995). Influence of dietary sucrose on biological aging. *Am. J. Clin. Nutr.* 62:284S - 293S.
- Mc Garry J. (2002). Dysregulation of Fatty Acid Metabolism in the Etiology of Type 2 Diabetes. *Diabetes* 51: 7-18.
- Miatello R, Vázquez M, Renna N, Cruzado M, Zumino AP and Risler N. (2005). Chronic administration of resveratrol prevents biochemical cardiovascular changes in fructose-fed rats. *Am. J. Hypertens.* 18, 864 - 870.
- Miles AM. (1996). Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. *Methods Enzymology* 268:105 -120.
- Miller AA, Drummond GR, Sobey CG. (2006). Novel isoforms of NADPH-oxidase in cerebral vascular control. *Pharmacol. Ther.* 111(3): 928 - 948.
- Moini H, Tirosh O, Chul Park Y, Cho KJ, Packer LR. (2002).  $\alpha$ -Lipoic Acid Action on Cell Redox Status, the insulin Receptor, and Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397 (2): 384 - 391.
- Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. (2003). Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors. *JAMA* 289 (1):76 -79.
- Montanaro MA, Lombardo YB, Gonzáles MS, Bernasconi AM, Chicco A, Rimoldi OJ, Basabe JC, Brenner RR. (2005). Effect of troglitazone on the desaturases in a

rat model of insulin-resistance induced by a sucrose-rich diet. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 72: 241- 250.

- Moreno MJ and Martínez JA. (2002). Adipose tissue: a storage and secretory organ. *An. Sist.Sanit. Navar.* 25 (suppl 1): 29 - 39.

- Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. (1999). The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA* 282 (16):1523-1529.

- Nandhini A, Thirunavukkarasu V, Ravichandran MK, Anuradha CV. (2005). Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. *Singapore Med. J.* 46: 82 - 87.

- Nikkila EA, Ojala K. (1966). Acute effects of fructose and glucose on the concentration and removal rate of plasma triglyceride. *Life Sci.* 5: 89 - 94.

- Oliveira HR,Verlengia R, Carvalho C, Britto LRG, Curi R, Carpinelli AR. (2003). Pancreatic B-cells express phagocyte-like NADPH oxidase. *Diabetes* 52 (6): 1457-1463.

- Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA, Pan DA. (1996). Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am. J. Physiol.* 271 (5Pt2): R1319 - R1326.

- Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, Jenkins AB, - Storlien LH. (1997). Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* 46: 983 - 988.

- Pellemounter M. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269: 540-543.

- Pérez Mayorga M. (2007). El adipocito como órgano endocrino: implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. *Rev. Fac. Med.* 15 (2): 225 - 242.

- Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 2002 - 2007.
- Picard F, Boivin A, Lalonde J, Deshaies Y. (2002). Resistance of adipose tissue lipoprotein lipase to insulin action in rats fed an obesity-promoting diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282 (2): E412-418.
- Podracká L, Sasinka M, Rácz O, Sipulová A, Gayová E, Horská M, Boor A. (1999). Relation between metabolism of trace elements and the antioxidant defense system in chronic nephropathies. *Cas Lek Cesk.* 138(11):337-9. Slovak.
- Poitout V and Robertson RP. (2002). Minireview: Secondary cell failure in type 2 diabetes a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143: 339–342.
- Rabini RA, Tesei M, Galeazzi T, Dousset N, Ferretti G, Mazzanti L. (1999). Increased susceptibility to peroxidation of VLDL from non-insulin-dependent diabetic patients: a possible correlation with fatty acid composition. *Mol. Cell Biochem.* 199: 63 - 67.
- Reaven GM, Risser TR, Chen YD, Reaven EP. (1979). Characterization of a model of dietary induced hypertriglyceridemia in young non obese rats. *J. Lipid Res.* 20: 371-378.
- Reaven GM. (1988). Banting lectura. Role of insulin-resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595 -1607.
- Rebolledo O, Marra C, Raschia A, Rodriguez S, Gagliardino JJ. (2007). *67th Scientific Sessions of the American Diabetes Association*, June 22 - 26, Chicago, USA.
- Rebolledo OR, Marra CA, Raschia A, Rodriguez S and Gagliardino JJ. (2008) Abdominal adipose tissue: early metabolic dysfunction associated to insulin

resistance and oxidative stress induced by an unbalanced diet. *Horm. Metab. Res.* 40, 794 - 800.

- Rebolledo A, Rebolledo OR, Marra CA, García ME, Roldán Palomo AR, Rimorini L, Gagliardino JJ. (2010). Early alterations in vascular contractility associated to changes in fatty acid composition and oxidative stress markers in perivascular adipose tissue. *Cardiovascular Diabetology* 9: 65-73.

- Reddy JK, Rao MS. (2006). Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290: G852 – G858.

- Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Arder DI. (2005). Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* 111(7):932-939.

- Robertson RP. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J. Biol. Chem.* 279:42351– 42354.

- Rodbell M. (1964). Metabolism of isolated fat cells. I effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *The J. Biol. Chem.* 239 (2): 375 - 380.

- Romero E, Bosch M, Romero M, Jareño E, Romero B, Marín N, et al. (1998). Lipid peroxidation and antioxidants in human disease. *Environmental Health Perspectives* 106: 1229 -1233.

- Rozen S, Skaletsky H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132: 365 – 386.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TE. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cols Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

- Schäffler A, Müller-Ladneru, Schölmerich J, Büchler C. (2006). Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. *Endocr. Rev.* 27: 449-467.
- Scherer PE. (2006). Adipose tissue from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55:1537-1545.
- Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobson P, Tornqvist H, Zechner R, Zimmermann R. (2006). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J. Biol. Chem.* 281: 40236 - 40241.
- Skibska B, Józefowicz-Okonkwo G, Goraca A. (2006). Protective effects of early administration of alpha-lipoic acid against lipopolysaccharide-induced plasma lipid peroxidation. *Pharmacological Reports* 58: 399-404.
- Sleder J, Chen YD, Cully MD, Reaven GR. (1980). Hyperinsulinemia in fructose induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism* 29: 303 -305.
- Smith U, Cahlin E, Schersten T. (1973). Sucrose feeding in man. *Acta Med. Scand.* 194: 147 – 150.
- Soria A, D'Alessandro ME, Lombardo YB. (2001). Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. *J. Appl. Physiol.* 91: 2109 – 2116.
- Sprague AH, Khalil RA. (2009). Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 78 (6): 539-552.
- Stein DT, Dobbins R, Szczepaniak L, Malloy C, Mc Garry JD. (1997). Skeletal muscle triglyceride stores are increased in insulin resistance (Abstract). *Diabetes* 46 (Suppl. 1): 23A.

- Storlien LH, Kraegen EW, Jenkins AB, Chishlom DJ. (1988). Effects of sucrose vs starch diets on *in vivo* insulin action, thermogenesis, and obesity in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 47: 420 - 427.
- Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AB, Khouri S, Kraegen EW. (1989). Fructose-induced *in vivo* insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 49:1155 -1163.
- Thrunavukkarasu V, Anitha Nandhini AT, Anuradha CV. (2004). Effect of alpha-lipoic acid on lipid profile in rats fed a high-fructose diet. *Exp. Diabetes Res.* 5: 195 – 200.
- Thrunavukkarasu V, Anuradha CV. (2004). Influence of  $\alpha$ -lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant defense system in blood of insulin-resistant rats. *Diabetes Obes. Metab.* 6: 200 – 207.
- Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S. (1998). Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes* 47:1578 -1585.
- Touyz RM. (2012). Reactive oxygen species and oxidative stress. *Primer on the Autonomic Nervous System (third edition)* Edited by: David Robertson, Italo Biaggioni, Geoffrey Burnstock, Phillip A. Low and Julian F.R. Paton. Copyright Elsevier Inc. ISBN: 978-0-12-386525-0.
- Ungvari Z, Labinsky N, Gupte S, Chander PN, Edwards JG, Csiszar A. (2008). Dysregulation of mitochondrial biogenesis in vascular endothelial and smooth muscle cells of aged rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294 (5): H2121-H2128.
- Verma S, Bhanot S, Yao L and McNeill JH. (1997). Vascular insulin resistance in fructose-hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 322, R1- R2.



- Vrána A, Fábry P, Slabochová Z, Kazdová L. (1974). Effect of dietary fructose on free fatty acid release from adipose tissue and serum free fatty acid concentration in the rat. *Nutr. Metab.* 17: 74 – 83.
- Waddell M & Fallon HJ. (1973). The effect of high carbohydrate diets on liver triglyceride formation in the rat. *J. Clin. Invest.* 52: 2725 - 2731.
- Walder K, Filippis A, Clark S, Zimmet P, Collier GR. (1997). Leptin inhibits insulin binding in isolated rat adipocytes. *J. Endocrinol.* 155: R5 - R7.
- Weisberg SP, Mc Cann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RI, Ferrante Jr AW. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112: 1796 -1808.
- Wolff SP, Dean RT. (1987). Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of “autoxidative glycosylation” in diabetes. *Biochem. J.* 245: 243 – 250.
- Xu XJ, Gauthier MS, Hess DT, Apovian CM, Cacicedo JM, Gokce N, Farb M, Valentine RJ, Ruderman NB. (2012) Insulin sensitive and resistant obesity in humans: AMPK activity, oxidative stress, and depot-specific changes in gene expression in adipose. *J. Lipid Res.* 53: 792 - 801.
- Yagi K. (1976). A simple fluorometric assay for lipoeroxides in blood plasma. *Biochem. Med.* 15: 121-126.
- Zavaroni I, Chen YI, Reaven GM. (1988). Studies on the mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism* 31: 1077-1083.

- Glycooxidative Stress-Induced Damage On Lipid Profile In A Fructose-Enriched Diet Model Of Insulin Resistance In Rats.

*García ME, Marra CA, Rebolledo OR.*

Archives of Physiology and Biochemistry, 116 (1): 42-49, 2010.

- Early Alterations In Vascular Contractility Associated To Changes In Fatty Acid Composition And Oxidative Stress Markers In Perivascular Adipose Tissue.

*Rebolledo A, Rebolledo OR, Marra CA, Garcia ME, Roldan Palomo AR, Rimorini L, Gagliardino JJ.*

Cardiovascular Diabetology 9: 65, 2010.

- Changes Induced By A Fructose-Rich Diet On Hepatic Metabolism And The Antioxidant System

*Flavio Francini, María C. Castro, Guillermo Schinella, María E. García, Bárbara Maiztegui, María A. Raschia, Juan J. Gagliardino, María L. Massa*

Life Sciences 86: 965–971, 2010.

- Islet NADPH Oxidase Activity Is Modulated Unevenly By Different Secretagogues.

*Oscar R. Rebolledo, María A. Raschia, María I. Borelli, , María E. García, Juan J. Gagliardino.*

Endocr. 38: 309-311, 2010.

- Effect Of Pioglitazone On The Fructose-Induced Abdominal Adipose Tissue Dysfunction.

*Alzamendi A, Giovambattista A, García ME, Rebolledo OR, Gagliardino JJ, Spinedi E.*

PPAR Res. 2012, Article ID 259093. doi: 10.1155/2012/259093.

- Antioxidant Treatment Prevents The Development Of Fructose-Induced Abdominal Adipose Tissue Dysfunction

*Fariña JP\*, García ME\*, Alzamendi A, Giovambattista A, Marra CA, Spinedi E, Gagliardino JJ.*

\*These authors contributed equally to this work.

Clinical Science 125: 87-97, 2013.

**- LIII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, noviembre 2008.**

DIETA RICA EN FRUCTOSA, METABOLISMO LIPÍDICO Y ESTRÉS OXIDATIVO EN EL TEJIDO ADIPOSEO ABDOMINAL.

*M E García 1, A Giovambattista 2, A Alzamendi 2, E Spinedi 2, A Raschia 1, C Marra 3, O Rebolledo 1, J J Gagliardino . Revista Medicina 68 (supl):76, resumen 0077.*

**- XVI Congreso Argentino de Diabetes. Buenos Aires, octubre, 2008.**

EFFECTO DE LA DIETA RICA EN FRUCTOSA SOBRE LA CONTRACTILIDAD VASCULAR Y MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN EL TEJIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR.

*Rebolledo A, García ME, Marra C, Rebolledo O, Roldán Palomo R, Rimorini L, Gagliardino JJ. Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes, 42 (2): 86 (resumen número 14).*

EFFECTOS DE LA DIETA RICA EN FRUCTOSA SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO DEL TEJIDO ADIPOSEO ABDOMINAL.

*García ME, Giovambattista A, Alzamendi A, Spinedi E, Raschia MA, Marra C, Rebolledo OR, Gagliardino JJ. Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes, 42 (2): 121 (resumen número 67).*

**- Congreso Argentino de Fisiología, reunión anual de la sociedad argentina de fisiología. La Plata, octubre 15, 2009.**

ALTERACIONES DEL ESTADO GLICOXIDATIVO Y PERFIL LIPÍDICO EN DIETA RICA EN FRUCTOSA.

*García ME, Marra C Gagliardino JJ, Rebolledo OR. Libro de resúmenes, 23 (ML2).*

EFFECTO DE LA NADPH-OXIDASA SOBRE EL MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR DIFERENTES ESTÍMULOS.

*Borelli MI, Raschia A, García ME, Rebolledo OR, Gagliardino JJ. Libro de resúmenes, 20 (EN2).*

**- LIV Reunión Científica anual SAIC-SAI. Mar del Plata, noviembre 18, 2009.**

ALTERACIONES PRECOCES DEL PERFIL LIPOPROTEICO DURANTE EL DESARROLLO DE UN ESTADO DE INSULINORESISTENCIA Y GLICOXIDATIVO.

*García ME, Marra C Gagliardino JJ, Rebolledo O. Medicina - Volumen 69 - (Supl. I) 65 (48), 2009.*

**- The 1st Latin America Congress on Controversies to Consensus in Diabetes, Obesity and Hypertension (CODHy), Buenos Aires, marzo 11-14, 2010.**

ALTERACIONES PRECOCES DEL PERFIL LIPOPROTEICO CONSECUTIVAS A LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS GLICOXIDATIVO.

*García María Elisa<sup>1</sup>, Marra Carlos Alberto<sup>2</sup>, Gagliardino Juan José, Rebolledo Oscar Remigio<sup>1</sup>. Libro de resúmenes, 40A*

## *IX. Presentaciones a congresos nacionales e internacionales*

---

**- XVII Congreso Argentino de Diabetes, Mar del Plata, noviembre 2010.**

MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA Y ALTERACIONES DEL PERFIL LIPOPROTEICO DURANTE EL DESARROLLO DE UN ESTADO DE INSULINORRESISTENCIA.

*Fariña JP, García ME, Marra CA, Gagliardino JJ, Rebolledo OR.*

Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes, 44: (4),293, 2010.

**- LV Reunión Científica anual SAIC-SAI. Mar del Plata, noviembre 18, 2010.**

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA NADPH OXIDASA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO DEL TEJIDO ADIPOSEO INDUCIDO POR DIETA RICA EN FRUCTOSA

*Fariña JP, García ME, Alzamendi A., Giovambatista A., Spinedi E., Gagliardino JJ.*

Medicina-Volumen 70 - (Supl. II) 87 (111), 2010.

**- LVI Reunión Científica anual SAIC-SAFIS. Mar del Plata, noviembre 16, 2011.**

EFFECTO DEL ÁCIDO LIPOICO SOBRE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA Y TEJIDO ADIPOSEO ABDOMINAL INDUCIDOS POR DIETA RICA EN FRUCTOSA.

*Fariña JP, García ME, Alzamendi A., Castro M., Francini F., Giovambatista A., Gagliardino JJ.*

Medicina-Volumen 71 - (Supl. III) 187 (425), 2011.