

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Departamento de Ciencias Biológicas

Laboratorio de Estudio de Enfermedades Relacionadas con la Nutrición

Tesis para la obtención del Grado Académico de  
Doctor en Ciencias Biológicas

## **“MECANISMOS QUE ANALIZAN A NIVEL HEPÁTICO EL DESTINO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DEL PLASMA Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA INSULÍNICA EN DISLIPEMIA EXPERIMENTAL. ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN Y/O MEJORAMIENTO POR DIETAS”**

Tesista:

**Licenciado en Biotecnología Gustavo Juan Hein**

Directora de Tesis:

**Dra. Yolanda Bolzón de Lombardo**

Co-Directora de Tesis:

**Dra. Adriana G. Chicco**

**AÑO 2010**

*A Daniela, por su apoyo incondicional.*

## AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Laboratorio de Estudio de Enfermedades Metabólicas Relacionadas con la Nutrición, del Departamento de Ciencias Biológicas (Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral), de la ciudad de Santa Fe.

La misma fue llevada a cabo bajo la dirección de la Dra. Yolanda Bolzón de Lombardo, Profesora Titular de la Cátedra de Química Biológica, Directora del Departamento de Ciencias Biológicas e Investigadora Principal de CONICET, y la codirección de la Dra. Adriana G. Chicco, Profesora Asociada de la Cátedra de Química Biológica e Investigadora Independiente de CONICET.

Quiero agradecer a quienes han colaborado en la realización de este trabajo de Tesis:

A las Doctoras Yolanda Bolzón de Lombardo y Adriana G. Chicco, quienes trabajaron arduamente con absoluta responsabilidad, compromiso y dedicación, orientándome y motivándome día a día en la realización de la presente Tesis.

Al Dr. Rodolfo R. Brenner, por su valiosa e incomparable contribución en parte de esta Tesis y a los compañeros del INIBIOLP: Mauro Montanaro, Ana Bernasconi, Magalí Pellón-Maison y Gabriela Finarelli por su apoyo en el desarrollo de la misma.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme la Beca que me permitió finalizar los estudios de Post-Grado en la carrera del Doctorado en Ciencias Biológicas.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) (PICT #05-38157 - BID OC/AR y PICTO #05-35670 - BID OC/AR), por posibilitar la realización de esta Tesis a través de sus subsidios.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por otorgarme la posibilidad de realizar mi formación de Post-Grado en este establecimiento.

A todos mis compañeros y amigos de trabajo: tesistas, tesinistas, pasantes, técnicos, docentes y no docentes del Departamento de Ciencias Biológicas, quienes compartieron y brindaron su apoyo diario en estos años de trabajo.

A mis padres, hermanos y familiares, por estar a mi lado siempre y en especial a mis esposa Daniela e hija Julieta por darle un sentido muy valioso a mi vida.

## ABREVIATURAS

**AA:** ácido araquidónico  
**ACC:** acetil-CoA carboxilasa  
**AGL:** ácidos grasos libres  
**AGNE:** ácido graso no esterificado  
**AHB:** aceite de hígado de bacalao  
**ALD:** aldolasa  
**AM:** aceite de maíz  
**AMPc:** adenosina monofosfato cíclico  
**Apo:** apolipoproteína  
**ChoRE:** elemento de respuesta a carbohidratos  
**ChREBP:** proteína que une elemento de respuesta a carbohidratos  
**CoA:** coenzima A  
**CPT 1:** carnitina palmitoiltransferasa 1  
**DAG:** diacil-glicerol  
**DC:** dieta control  
**DHA:** ácido docosaheptaenoico  
**DMNID:** diabetes mellitus no insulino-dependiente  
**DRS:** dieta rica en sacarosa  
**EM:** enzima mállica  
**EPA:** ácido eicosapentaenoico  
**F-1,6-P<sub>2</sub>asa:** fructosa-1,6-bifosfatasa  
**F-1-P:** fructosa-1-fosfato  
**FAO:** oxidasa de ácidos grasos  
**FAS:** sintasa de ácidos grasos  
**FAT:** proteína translocasa  
**FATP:** proteína transportadora de ácidos grasos  
**FK:** fructoquinasa  
**6-FGDH:** 6-fosfo-gluconato dehidrogenasa  
**G-6-P:** glucosa-6-fosfato  
**G-6-PDH:** glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa  
**G-6-P-Pasa:** glucosa-6-fosfato-fosfatasa  
**G-6-P-T:** proteína translocasa de glucosa-6-fosfato  
**GF:** glucógeno fosforilasa  
**GK:** glucoquinasa  
**GKRP:** proteína reguladora de glucoquinasa  
**GLUT 2:** transportador de glucosa 2  
**GRU:** unidad de respuesta a glucocorticoides  
**GS:** glucógeno sintasa

**HDL:** lipoproteína de alta densidad  
**HK:** hexoquinasa  
**HL:** lipasa hepática  
**HMG-CoAS:** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa  
**IDL:** lipoproteína de densidad intermedia  
**IR:** receptor de insulina  
**IRI:** insulina inmunorreactiva  
**IRS-1 e IRS-2:** sustrato receptor de insulina 1 y 2  
**LDH:** lactato deshidrogenasa  
**LDs:** lipid droplets  
**L-PK:** piruvato quinasa hepática  
**LPL:** lipoproteína lipasa  
**LXR- $\alpha$ :** receptor X hepático alfa  
**MAP:** proteína quinasa activada por mitógeno  
**Mlx:** proteína X similar a Max  
**NADH:** nicotinamida adenina dinucleótido  
**NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
**PDHc:** complejo piruvato dehidrogenasa  
**PEPCK:** fosfoenolpiruvato carboxiquinasa  
**PFK:** fosfofructoquinasa  
**PKC:** proteína quinasa C  
**PPAR- $\alpha$ :** receptores nucleares alfa activadores de la proliferación peroxisomal  
**PPER:** elementos de respuesta a los proliferadores de peroxisomas  
**PUFAs:** ácidos grasos polinosaturados  
**Q:** quilomicrones  
**RI:** resistencia insulínica  
**SCD 1:** estearoil-CoA desaturasa 1  
**SREBP-1c:** proteína-1c que une elementos reguladores de esteroides  
**Tg:** triglicéridos  
**TK:** tioquinasa  
**TPI:** tiosafosfato isomerasa  
**VLDL:** lipoproteína de muy baja densidad  
**VSTG:** velocidad de secreción plasmática de triglicéridos  
**X-5-P:** xilulosa-5-fosfato  
 **$\alpha$ p85 PI3K:** subunidad alfa p85 de la fosfatidilinositol-3-quinasa

## INDICE GENERAL

	Página
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO HEPÁTICO.....	1
1.1. Metabolismo hepático de hidratos de carbono.....	2
1.1.1. Rol del hígado en el control de la homeostasis de carbohidratos...	2
1.2. Metabolismo de los lípidos hepáticos.....	7
1.2.1. Regulación de enzimas claves involucradas en el metabolismo lipídico.....	17
1.2.1.1. Receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPARs)....	17
1.2.1.2. Proteínas que unen elementos reguladores de esteroides (SREBPs)..	19
1.2.1.3. Receptores X hepáticos (LXRs).....	19
1.3. Cascada de señalización de la insulina.....	20
2. SÍNDROME METABÓLICO.....	23
2.1. MODELOS EXPERIMENTALES.....	24
2.1.1. Modelos experimentales genéticos de dislipemia, resistencia insulínica y diabetes tipo 2 asociada a obesidad.....	24
2.1.2. Modelos experimentales de dislipemia, resistencia insulínica y anormal homeostasis a la glucosa por manipulaciones nutricionales.....	25
2.1.3. Descripción del modelo Dieta rica en sacarosa (DRS).....	27
<b>OBJETIVOS</b> .....	33
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	35
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DIETAS.....	35
2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE Y TEJIDOS.....	41
3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES - Métodos Analíticos.....	41
3.1. Determinaciones séricas.....	41
3.2. Determinaciones en tejido hepático.....	43
3.2.1. Determinación de metabolitos.....	43

3.2.2. Análisis lipídico.....	47
3.2.3. Determinación de actividades enzimáticas.....	47
3.2.3.1. Enzimas de oxidación de ácidos grasos.....	47
	<b>Página</b>
3.2.3.2. Enzimas lipogénicas.....	49
3.2.3.3. Enzimas de desaturación de ácidos grasos.....	50
3.2.3.4. Enzimas implicadas en el metabolismo de hidratos de carbono.....	51
3.2.4. Aislamiento del ARN mensajero (ARNm) y determinación de la expresión génica de la SCD-1, $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas.....	56
3.2.5. Análisis de masa proteica por la técnica Western Blot.....	57
3.3. Estudios que analizan los mecanismos de la hipertrigliceridemia....	60
3.3.1. Velocidad de secreción de triglicéridos hepáticos (VSTG).....	60
3.3.2. Test de tolerancia grasa endovenoso: Determinación de la velocidad de remoción de triglicéridos plasmáticos.....	62
3.4. Capacidad de utilización de la glucosa por los tejidos "in vivo". Clamp euglucémica-hiperinsulinémica.....	63
4. REACTIVOS UTILIZADOS.....	64
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES.....	64
<b>RESULTADOS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>66</b>
<b>PARTE 1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO.....</b>	<b>67</b>
1.1. Incremento de peso corporal e ingesta calórica.....	67
1.2. Determinaciones plasmáticas y contenido de triglicéridos hepáticos....	70
1.3. Sensibilidad insulínica periférica global: Velocidad de Infusión de Glucosa (VIG) (clamp euglucémica-hiperinsulinémica).....	72
<b>PARTE 2. ESTUDIO DE ALGUNOS MECANISMOS A NIVEL HEPÁTICO QUE ANALIZAN EL DESTINO METABÓLICO DE LA MAYOR DISPONIBILIDAD DE AGNE PLASMÁTICOS Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA INSULÍNICA.....</b>	<b>75</b>

2.1. Actividades de enzimas lipogénicas.....	75
2.2. Actividades de enzimas de la oxidación de ácidos grasos.....	76
2.3. Expresión de la masa proteica de los receptores nucleares PPAR- $\alpha$ y LXR- $\alpha$ .....	77
2.4. Efecto de la DRS sobre la expresión y actividades enzimáticas de SCD-1, $\Delta$ 5 y $\Delta$ 6 desaturasas. Acción del AHB.....	81
2.5. Efecto de la DRS sobre el contenido y la composición de AG en lípidos hepáticos. Acción del AHB.....	83
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>88</b>
<b>PARTE 3. METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y VIAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN HÍGADO DE RATAS DISLIPÉMICAS INSULINO RESISTENTES. EFECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS N-3 PUFAs DIETARIOS..</b>	<b>94</b>
3.1. Efecto de la DRS sobre la fosforilación de la glucosa. Acción del AHB.....	95
3.2. Efecto de la DRS sobre la vía no oxidativa de la glucosa. Acción del AHB.....	96
3.3. Intermediarios de la vía glicolítica y actividad de la enzima piruvato quinasa (PK): efecto de la administración de DRS. Acción del AHB.....	97
3.4. Efecto de la DRS sobre la actividad del complejo enzimático de la piruvato dehidrogenasa (PDHc) -estimación de la vía oxidativa de la glucosa - Acción del AHB.....	98
3.5. Efecto de la DRS sobre enzimas de la gluconeogénesis. Acción del AHB.....	98
3.6. Efecto de la DRS sobre la expresión de la masa proteica del sustrato receptor de insulina 1 (IRS-1) y subunidad $\alpha$ p85 de la fosfatidilinositol-3-quinasa ( $\alpha$ p85 PI3K) hepática. Acción del AHB.....	100
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>102</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>111</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>113</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>116</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>119</b>

## TABLAS Y FIGURAS

### *Tablas*

	Página
<b>Tabla 1.</b> Composición de las dietas experimentales.....	37
<b>Tabla 2.</b> Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de las diferentes fuentes de grasa.....	39
<b>Tabla 3.</b> Composición de ácidos grasos (% p/p) de las diferentes dietas administradas a los animales durante todo período experimental.....	40
<b>Tabla 4.</b> Niveles plasmáticos de triglicéridos, ácidos grasos no esterificados (AGNE), glucosa, colesterol total e insulina y contenido de triglicéridos hepáticos en ratas alimentadas con DC, DRS o DRS+AHB al final del período experimental.....	71
<b>Tabla 5.</b> Actividades de SCD-1, $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas de microsomas hepáticos de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del período experimental.....	82
<b>Tabla 6.</b> Composición de AG en homogeneizado hepático (%p/p) de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del período experimental.....	85
<b>Tabla 7.</b> Composición de AG en fosfolípidos microsomales hepáticos (%p/p) de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del período experimental.....	85
<b>Tabla 8.</b> Principales especies moleculares de fosfatidilcolina de microsomas hepáticos (%p/p) de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del período experimental.....	87

<b>Tabla 9.</b> Actividades enzimáticas glucoquinasa (GK) y hexoquinasa (HK) en hígado de animales alimentados con DC, DRS ó DRS+AHB al final del período experimental.....	<b>95</b>
---	-----------

<b>Tabla 10.</b> Actividad enzimática del complejo PDH (PDHc) en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS ó DRS+AHB al final del período experimental.....	<b>98</b>
---	-----------

## ***Figuras***

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Esquema del metabolismo de glucosa y fructosa.....	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Captación de ácidos grasos libres (AGL) en el hepatocito.....	<b>10</b>
<b>Figura 3.</b> Metabolismo de lípidos.....	<b>12</b>
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de las dos principales vías que intervienen en la cascada de señales de la insulina.....	<b>22</b>
<b>Figura 5.</b> Esquema experimental.....	<b>36</b>
<b>Figura 6.</b> Peso corporal e ingesta calórica de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o dieta rica en sacarosa + aceite de hígado de bacalao (DRS+AHB).....	<b>69</b>
<b>Figura 7.</b> Velocidad de infusión de glucosa (VIG) en ratas alimentadas con DC, DRS ó DRS+AHB al final del período experimental.....	<b>73</b>
<b>Figura 8.</b> Actividades de las enzimas: sintasa de ácidos grasos (FAS), enzima málica (EM) y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-PDH) en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del período experimental.....	<b>76</b>
<b>Figura 9.</b> Actividades de las enzimas: carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT 1) y oxidasa de ácidos grasos (FAO) en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del periodo experimental.....	<b>77</b>
<b>Figura 10.</b> Expresión de la masa proteica del PPAR- $\alpha$ en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del período experimental.....	<b>79</b>
<b>Figura 11.</b> Expresión de la masa proteica de LXR- $\alpha$ hepático de ratas alimentadas con DC, DRS ó DRS+AHB al final del período experimental.....	<b>80</b>

	<b>Página</b>
<b>Figura 12.</b> Expresión de ARNm de SCD-1, $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS o DRS+AHB al final del período experimental.....	<b>82</b>
<b>Figura 13.</b> Actividad GS y contenido de glucógeno y G-6-P en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS ó DRS+AHB al final del período experimental.....	<b>96</b>
<b>Figura 14.</b> Concentración F-1-P y F-2,6-P <sub>2</sub> y actividad PK en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS ó DRS+AHB al final del período experimental.....	<b>97</b>
<b>Figura 15.</b> Actividades PEPCK y G-6-P-Pasa en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS ó DRS+AHB al final del período experimental.....	<b>99</b>
<b>Figura 16.</b> Expresión de la masa proteica del IRS-1 y $\alpha$ P85 PI3K en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del período experimental.....	<b>101</b>

# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

### 1. CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO HEPÁTICO.

El hígado posee una posición anatómica estratégica en el organismo que le confiere un rol especial en el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Collier y Scott, 2004). Desempeña muchas funciones metabólicas, aportando al cuerpo la energía necesaria, regulando la producción, almacenamiento y liberación de azúcar y lípidos (lipoproteínas). La respuesta metabólica a los períodos de ayuno o a la ingesta de diferentes nutrientes, está regulada por una serie de interacciones complejas en las que intervienen sustratos, enzimas, hormonas, receptores nucleares, etc., e involucra varios órganos y se encuentra coordinada por el hígado.

Este importante órgano es responsable de la síntesis de glucosa durante el ayuno, y de la captación, almacenamiento y utilización de ésta como fuente energética en los períodos de alimentación (Collier y Scott, 2004). Este proceso es direccionado por una serie de factores de transcripción, coactivadores y corepresores que actúan como sensores transcripcionales del estado nutricional del organismo. El tejido hepático capta aproximadamente del 20 al 30% de la glucosa absorbida y contribuye mayoritariamente al depósito de la misma (Cherrington, 1999), siendo capaz de mantener la concentración de glucosa en el rango normal durante períodos cortos y largos de tiempo -por horas- (Postic, 2004). Además, constituye el principal sitio de extracción y metabolismo de fructosa (50 al 70% aproximadamente) (Mayes, 1993).

Además, el hígado tiene la capacidad de sintetizar lípidos y metabolizar los que arriban al hepatocito de numerosas formas. Tanto los ácidos grasos libres transportados por la albúmina y triglicéridos, colesterol, fosfolípidos, transportados por las lipoproteínas de la circulación, son captados por este tejido y pueden ser direccionados a diferentes vías metabólicas según las necesidades fisiológicas del organismo (Bradbury, 2006).



## 1.1. Metabolismo hepático de hidratos de carbono.

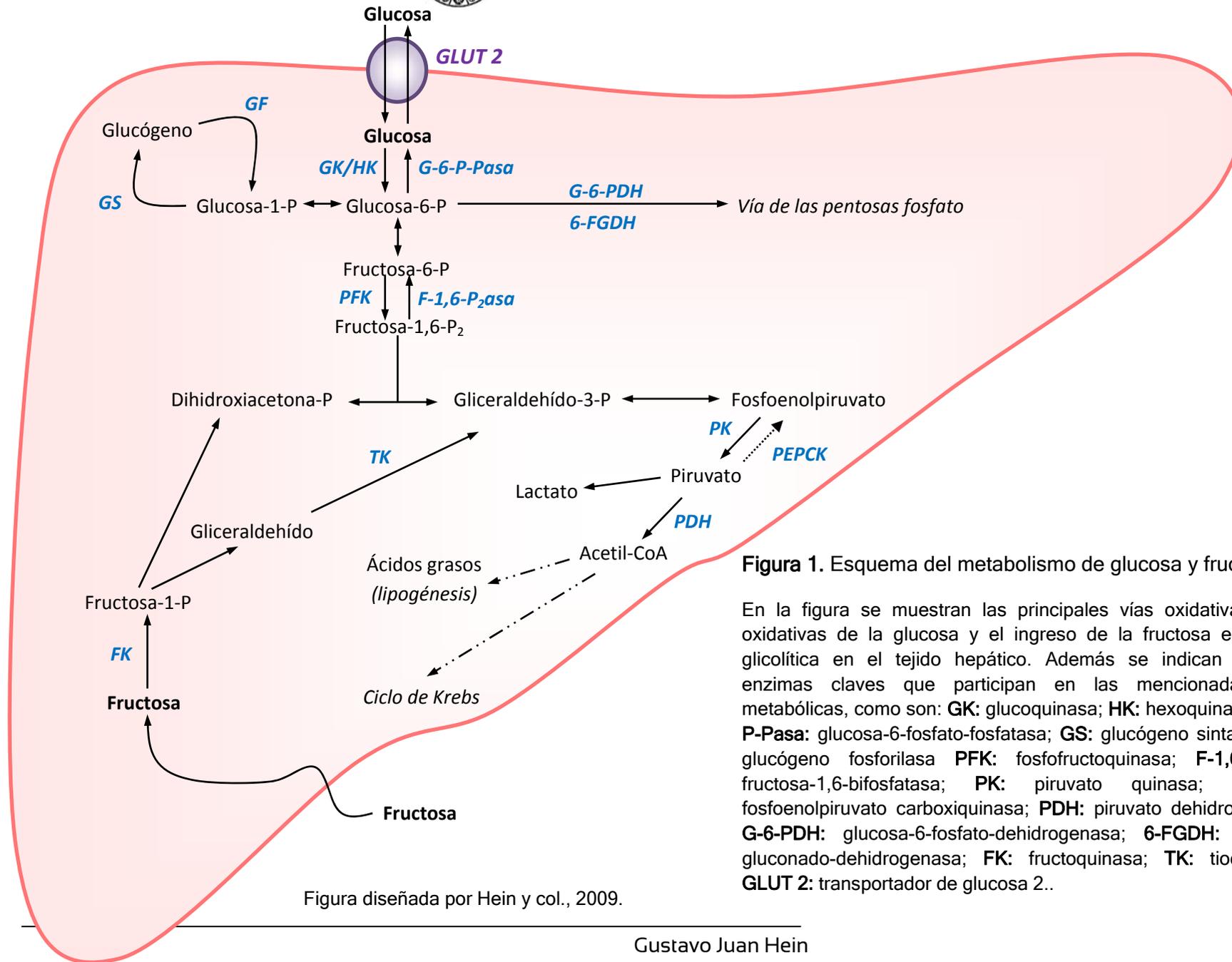
### 1.1.1. Rol del hígado en el control de la homeostasis de carbohidratos.

Los carbohidratos son constituyentes principales del alimento y en los tejidos animales desempeñan funciones estructurales y metabólicas. La glucosa es el hidrato de carbono más importante en la bioquímica de los mamíferos, resultando la primordial o única molécula energética empleada por una serie de células especializadas (células del cerebro y eritrocitos). El entendimiento de las rutas metabólicas de este carbohidrato, así como su regulación, es necesario debido a su importante rol en el organismo.

El hígado es el tejido que contribuye en mayor medida a los niveles de la glucosa circulante. Funciona como el principal “órgano buffer” capaz de proveer glucosa al organismo cuando los nutrientes escasean y almacenar glucosa como glucógeno cuando los alimentos abundan (Desvergne y col., 2005).

La **Figura 1** resume las principales vías metabólicas de la glucosa en el tejido hepático. La glucosa plasmática ingresa al hepatocito por difusión facilitada a través de su transportador GLUT 2. El principal rol del GLUT 2 en los tejidos gluconeogénicos, es permitir un equilibrio rápido entre la glucosa intra y extracelular y en particular una secreción rápida de glucosa bajo condiciones gluconeogénicas -niveles bajos de insulina y altos de glucagón- (Vaulont y col., 2000).

Luego de ingresar al hepatocito, la glucosa debe ser metabolizada con el fin de generar señales intracelulares que permitan la regulación transcripcional de numerosos genes. La glucosa es rápidamente fosforilada a glucosa-6-fosfato (G-6-P) por acción de la enzima hexoquinasa (HK) y principalmente por acción de la enzima de baja afinidad denominada glucoquinasa (GK). La GK se diferencia de las demás HKs que están presentes en el hígado y en otros tejidos, en su elevada  $K_m$  para la glucosa y no se inhibe por el producto de la reacción que cataliza (G-6-P) a concentraciones fisiológicas. El promotor del gen de la GK hepática es activado por la insulina e inhibido por el glucagón (Matsuda y col., 1990) (Magnuson, 1992). Además, la GK está regulada negativamente a nivel post-translacional por su interacción con una proteína reguladora (GKRP) que se une a ella y la mantiene secuestrada en el núcleo a baja concentraciones de glucosa (De La Iglesia y col., 2000). El efecto inhibitorio de la GKRP es estimulado por la fructosa-6-fosfato, favoreciendo el secuestro de la GK en el



**Figura 1.** Esquema del metabolismo de glucosa y fructosa.

En la figura se muestran las principales vías oxidativas y no oxidativas de la glucosa y el ingreso de la fructosa en la vía glicolítica en el tejido hepático. Además se indican algunas enzimas claves que participan en las mencionadas vías metabólicas, como son: **GK**: glucoquinasa; **HK**: hexoquinasa; **G-6-P-Pasa**: glucosa-6-fosfato-fosfatasa; **GS**: glucógeno sintasa; **GF**: glucógeno fosforilasa; **PFK**: fosfofructoquinasa; **F-1,6-P<sub>2</sub>asa**: fructosa-1,6-bifosfatasa; **PK**: piruvato quinasa; **PEPCK**: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; **PDH**: piruvato dehidrogenasa; **G-6-PDH**: glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa; **6-FGDH**: 6-fosfogluconado-dehidrogenasa; **FK**: fructoquinasa; **TK**: tioquinasa; **GLUT 2**: transportador de glucosa 2..



núcleo; mientras que la fructosa-1-fosfato facilita su translocación al citosol donde la enzima puede tener libre acceso a las unidades de glucosa (Davies y col., 1990).

La hidrólisis de la G-6-P es catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato-fosfatasa (G-6-P-Pasa) y conduce a la liberación de glucosa hepática a la circulación. La transcripción de G-6-P-Pasa se incrementa en los períodos de ayuno y está regulada negativamente por la insulina (Aiston y col., 1999). La hidrólisis de la G-6-P involucra una proteína translocasa (G-6-P-T), que transporta la G-6-P a través del retículo endoplasmático, y una subunidad catalítica G-6-P-Pasa que está localizada en el lado luminal del retículo. Los nutrientes tales como lípidos, fructosa, glicerol, etc., incrementan la expresión genética de la subunidad catalítica G-6-P-Pasa (Massillon y col., 1997) (Bizeau y col., 2001) (Massillon, 2001).

Las actividades relativas de estas dos enzimas (GK y G-6-P-Pasa), las cuales catalizan el primer y último paso de utilización y producción de glucosa respectivamente, se cree que tienen un rol muy importante en la homeostasis de la glucosa sanguínea y sus actividades están altamente influenciadas por la acción de la insulina (Aiston y col., 1999).

La salida neta de glucosa es el resultado de dos vías que ocurren simultáneamente y que están altamente reguladas como son la glucogenólisis (hidrólisis de glucógeno) y la gluconeogénesis (síntesis de glucosa). La contribución exacta de estos dos procesos aún resulta controversial (Postic, 2004).

El flujo gluconeogénico requiere sustratos y precursores tales como lactato, aminoácidos y glicerol, por lo tanto la regulación de la magnitud de la gluconeogénesis así como también la salida de glucosa hepática, están íntimamente ligadas a los ácidos grasos libres y a los precursores gluconeogénicos (Bizeau y col., 2005). La gluconeogénesis es importante durante ayunos prolongados y participan tres enzimas: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), fructosa-1,6-bifosfatasa (F-1,6-P<sub>2</sub>asa) y G-6-P-Pasa. Los genes que controlan estas enzimas están regulados a nivel transcripcional por hormonas, principalmente insulina, glucagón y glucocorticoides. La insulina es capaz de inhibir la gluconeogénesis “down regulando” la expresión de PEPCK y G-6-P-Pasa (Barthel y Schmoll, 2003), mientras que el glucagón y los glucocorticoides estimulan la producción de glucosa “up regulando” la expresión de los genes de dichas enzimas (Postic, 2004). El incremento de insulina plasmática luego de una ingesta con carbohidratos, disminuye la síntesis de PEPCK ya que inhibe directa y rápidamente su transcripción genética (Granner y col., 1983). Los niveles plasmáticos elevados de



glucagón (o el AMP cíclico intracelular -AMPc), característicos de las condiciones de ayuno, inducen la síntesis de PEPCK y su regulación a nivel transcripcional. Por otro lado, los glucocorticoides estimulan la transcripción de PEPCK a través de la unidad de respuesta a glucocorticoides (GRU) (Granner y Pilkis, 1990). Los efectos de la insulina y el AMPc sobre la expresión de F-1,6-P<sub>2</sub>asa, son similares a la regulación genética que tienen sobre PEPCK.

La G-6-P puede seguir diferentes vías, pudiendo ser: a) desfosforilada por medio de la enzima G-6-P-Pasa y de esta manera la glucosa libre resultante pasará a la circulación periférica manteniendo la normoglucemia; b) degradada mediante glucólisis anaerobia hasta piruvato - lactato; c) el piruvato puede convertirse en acetil-CoA vía complejo piruvato dehidrogenasa (PDHc) (vía oxidativa) y de allí continuar al ciclo de los ácidos tricarbónicos y fosforilación oxidativa, proporcionando energía a la célula hepática; a su vez el acetil-CoA puede ser además convertido en citrato, en presencia de oxalacetato en el interior mitocondrial, y este citrato en el citosol transformarse nuevamente a acetil-CoA para sintetizar ácidos grasos de novo; d) utilizada para la obtención de equivalentes de reducción (NADPH) por medio de la vía de las pentosas fosfato; y e) transformada en glucógeno hepático, mediante la acción de la glucógeno sintasa (GS).

El metabolismo del glucógeno está controlado por las actividades de las enzimas: glucógeno fosforilasa (GF) y glucógeno sintasa (GS), y por cambios en el equilibrio hormonal. La activación (por fosforilación) de la GF está regulada por varias hormonas, entre ellas el glucagón, las catecolaminas, la adrenalina y la noradrenalina. Además la GF se encuentra inhibida por la insulina y la glucosa. En la síntesis del glucógeno hepático participa activamente la GS, que cataliza el paso limitante en la síntesis del polímero. En el hígado, esta enzima se encuentra altamente fosforilada y se activa por defosforilación cuando la actividad de la fosforilasa está tres veces por debajo de su valor habitual (Nuttall y col., 1981).

La ingesta de fructosa en forma de mono o disacárido (sacarosa), tiene fácil acceso a las vías metabólicas hepáticas con consecuencias importantes en el metabolismo de la glucosa y lípidos en este tejido, ya que obvia el paso principal de control de la glucólisis, catalizado por la fosfofructoquinasa. La fructosa es fosforilada a fructosa-1-fosfato (F-1-P) por acción de la enzima fructoquinasa (FK) y ésta puede ser convertida por acción de la aldolasa "B" en gliceraldehído y fosfato de dihidroxiacetona.



Los productos originados a partir del metabolismo de la fructosa a través de la vía glucolítica hepática son glucosa, glucógeno, lactato y piruvato (Elliott y col., 2002). Gergely y col. (1985) estudiaron en hígado de ratas mediante la administración de fructosa, los efectos de la concentración de F-1-P sobre la regulación de la GS. Ellos encontraron que la F-1-P condujo a un incremento en la síntesis de glucógeno hepático, activando la glucógeno sintasa hepática inactiva (GSb) y promoviendo la conversión de la GSb a su forma activa (GSa). De acuerdo a este estudio, el aumento de F-1-P incrementa la afinidad de la GSb por su sustrato (UDP-glucosa). Por otro lado, Youn y col. (1987) demostraron que la fructosa a través de la F-1-P, promueve la síntesis de glucógeno en el hígado suprimiendo la glucogenólisis por una inhibición alostérica de la fosforilasa que interviene en la hidrólisis del glucógeno.

Diferentes estudios con dietas ricas en carbohidratos sugirieron la existencia de un factor de transcripción en común, capaz de unirse a un sitio conservado en las regiones promotoras de los genes denominado “elemento de respuesta a carbohidratos” (ChoRE) (Shih y col., 1995) (Towle y col., 1997) (Girard y col., 1997). Este factor de transcripción se lo designó como “proteína que une elemento de respuesta a carbohidratos” (ChREBP) (Yamashita y col., 2001) (Cairo y col., 2001).

ChREBP se expresa abundantemente en órganos tales como hígado, tejido adiposo, intestino delgado, riñón y músculo, dependiendo del estado nutricional (Iizuka y col., 2004) (Yamashita y col., 2001). En los últimos años se asoció al factor de transcripción ChREBP con la respuesta a la glucosa. Yamashita y col. (2001) demostraron que ChREBP -activado por glucosa- se une directamente al sitio ChoRE del promotor de la piruvato quinasa hepática (L-PK) y activa la expresión génica de esta enzima.

En condiciones basales ChREBP se localiza en el citosol y su translocación nuclear, que resulta favorecida por la desfosforilación de varios residuos de serina, se induce rápidamente cuando la concentración de glucosa se incrementa. Además una “proteína fosfatasa 2A” (PP2A), la cual es activada selectivamente por xilulosa-5-fosfato (X-5-P), es responsable de la defosforilación tanto citosólica como nuclear del ChREBP (Kabashima y col., 2003). Hasta el presente, está claro que tanto la G-6-P como la X-5-P, son metabolitos intermediarios responsables de la activación del ChREBP por la glucosa (Girard y col., 1997) (Kabashima y col., 2003). ChREBP se heterodimeriza con una proteína llamada “proteína X similar a Max” (Mlx) y forma un complejo ChREBP/Mlx necesario para la respuesta a la glucosa (Ma y col., 2005). Sin embargo, aún queda por



determinar si Mlx está regulada también por la glucosa y donde ocurre su heterodimerización con ChREBP. Por otro lado, se desconoce si otros factores de transcripción o cofactores participan en la regulación -dependiente de glucosa- de la expresión de genes en el tejido hepático (Dentin y col., 2006).

## 1.2. Metabolismo de los lípidos hepáticos.

Los lípidos son constituyentes importantes de la alimentación, no sólo por su elevado valor energético, sino también por las vitaminas liposolubles y los ácidos grasos esenciales contenidos en la grasa de los alimentos naturales.

El metabolismo de los lípidos involucra numerosas secuencias metabólicas (Cooper, 1997). Brevemente, los lípidos provenientes de la dieta (exógenos), son hidrolizados en moléculas simples en el lumen del intestino durante el proceso de absorción, e ingresan a la circulación plasmática desde la linfa en la forma de quilomicrones (Q), lipoproteínas originadas en las células de la mucosa del intestino. Cuando alcanzan la circulación, los triglicéridos (Tg) transportados por estos Q, son hidrolizados por acción de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) de los tejidos extrahepáticos y se originan los Q remanentes (Erskine y col., 1994) (Seboková y Klimes, 1997). Los Q remanentes son responsables de la distribución dietaria de colesterol y el resto de los Tg hacia el hígado (Redgrave, 1970). Por su parte, el hígado sintetiza y secreta otras lipoproteínas: la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), la cual constituye el vehículo de transporte de los Tg endógenos sintetizados desde el hígado hacia los tejidos extrahepáticos (Jump y Clarke, 1999) y la lipoproteína de alta densidad (HDL) que interviene en el metabolismo de las VLDL y los Q y también en el transporte del colesterol.

El hígado recibe los lípidos transportados por las lipoproteínas (Q remanente y lipoproteína de densidad intermedia (IDL) y un porcentaje de la lipoproteína de baja densidad (LDL)) o directamente ácidos grasos libres (AGL) de la circulación unidos a la albúmina provenientes de la lipólisis del tejido adiposo (Den Boer y col., 2004). Este órgano posee la lipasa hepática (HL), una enzima sintetizada por el hepatocito y localizada en la superficie de los capilares sinusoidales, que puede considerarse como una lipasa del compartimento vascular y comparte numerosas similitudes estructurales y funcionales con la LPL de los tejidos extrahepáticos (Perret y col., 2002). La HL es una enzima lipolítica que no solo hidroliza los Tg y fosfolípidos presentes en las lipoproteínas

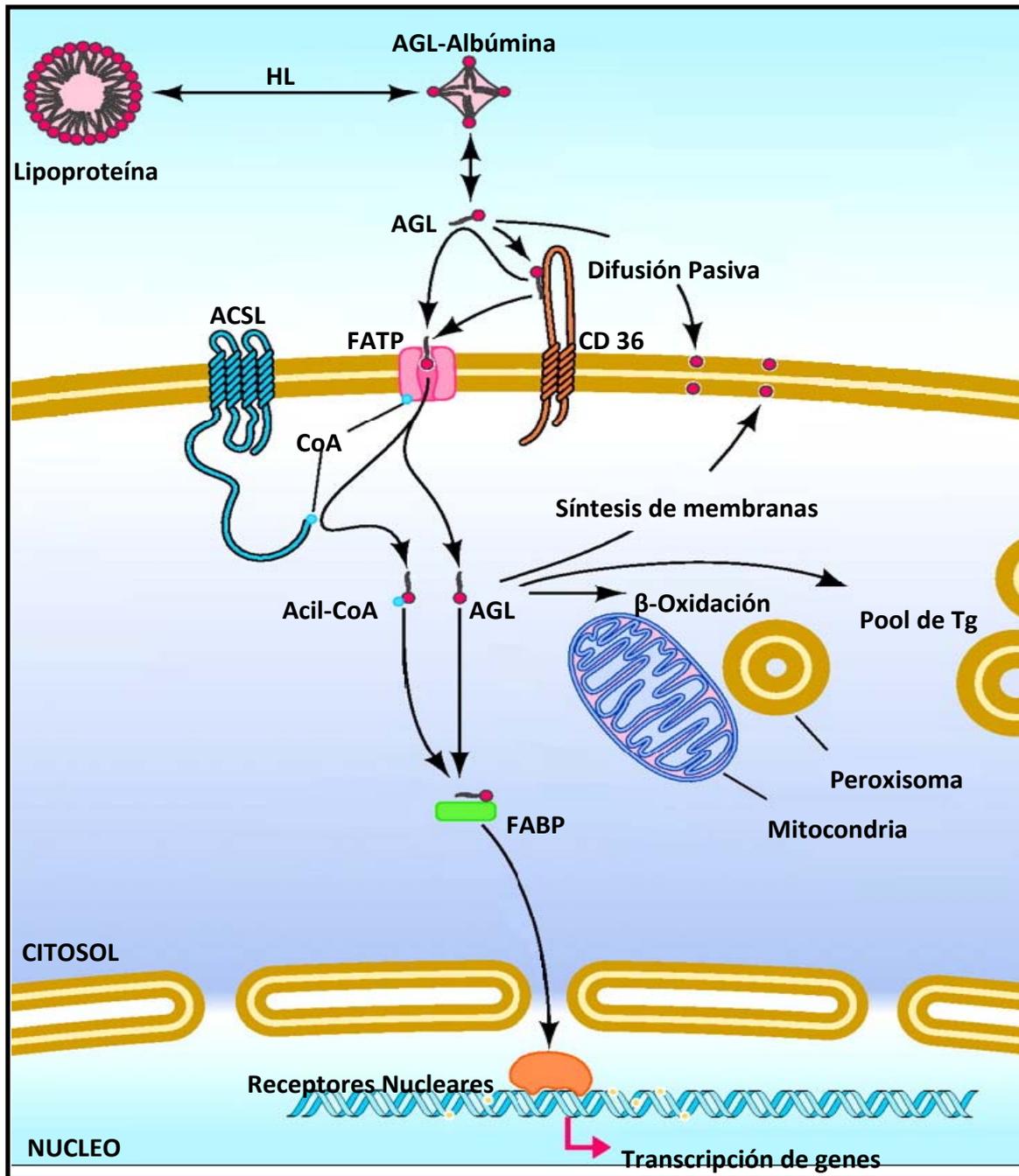


plasmáticas circulantes liberando los ácidos grasos, sino que además sirve como ligando de receptores celulares y proteoglicanos, facilitando su captación; mientras que la LPL (expresada principalmente en tejido adiposo y músculo) hidroliza los Tg de los Q y VLDL (Santamarina-Fojo y col., 2004). A diferencia de la LPL, la HL no necesita de las apolipoproteínas C-II para su actividad enzimática. La actividad de HL en hígado es inducida por los niveles de andrógenos, las hormonas tiroideas T3 y T4 y ciertas drogas como los fibratos, y es inhibida por los estrógenos, glucocorticoides, colesterol, etc. (Perret y col., 2002).

Los ácidos grasos libres (AGL) son transportados, en la circulación, unidos a la albúmina plasmática o vehiculizados en las lipoproteínas formando parte de los Tg, fosfolípidos y colesterol esterificado. Los mecanismos por los cuales los ácidos grasos ingresan al interior de la célula no están aún bien dilucidados. Ellos pueden difundir al interior celular, o resultar de un proceso mediado por alguna proteína transportadora de AG (FATP) o una translocasa (FAT) como la CD36 (Abumrad y col., 1998) o ser el resultado de una combinación de todos estos procesos (McArthur y col., 1999) (Sampath y Ntambi, 2005) (Nguyen y col., 2008). Un candidato propuesto para el transporte de AG en el tejido adiposo e hígado son las FATPs (Jump y Clarke, 1999). Doege y Stahl (2006), demostraron la presencia de FATPs y su función de transporte de los AG a través de las membranas celulares. Las funciones y características de estas FATPs se encuentran en estudio. Dentro de la familia de las FATPs, FATP 5 se expresa solamente en hígado y se localiza en la membrana plasmática. FATP 5 fue asociada a funciones de transporte de los AGL, pero además diferentes estudios demostraron que incrementó las actividades de enzimas como la acil-CoA sintasa y ácido biliar-CoA sintasa (Steinberg y col., 1999) (Mihalik y col., 2002).

En el compartimento intracelular, los AGL luego de liberarse de la albúmina, se unen inmediatamente a la coenzima A (CoA), proceso catalizado por la enzima acil-CoA sintasa hepática (ACSL) que se encuentra anclada en la membrana celular. Una de las condiciones requeridas para que los AGL participen en las diferentes vías metabólicas es la formación de acil-CoA-tioésteres (acil-CoA). Posteriormente, el acil-CoA se une a una proteína citosólica (proteína que une ácidos grasos -FABP-) que facilita su solubilización y posibilita su transporte a los diferentes compartimentos celulares (Coe y Bernlohr, 1998). Alternativamente, los acil-CoA pueden ser incorporados en lípidos más complejos como los Tg y fosfolípidos o ser oxidados o tener efectos importantes sobre la regulación génica y vías de señalización (**Figura 2**).

Figura 2. Captación de ácidos grasos libres (AGL) en el hepatocito.



(Doege y Stahl, 2006 - Fig. modificada)

Los AGL pueden ingresar al interior del hepatocito por difusión, o mediado por una proteína transportadora de AG (FATP) o una translocasa (FAT) como la CD36, o resulta una combinación de todos estos procesos. En el interior los AG pueden actuar en diferentes localizaciones celulares y cumplir con numerosas funciones de generación y almacenamiento de energía, síntesis de membranas, y activación de factores nucleares de transcripción.



La **Figura 3** representa algunas de las vías más importantes del metabolismo de lípidos en el hígado. Como mencionáramos anteriormente, el hígado puede captar de la circulación AGL pudiendo seguir dos caminos principales en el interior del hepatocito: 1) su oxidación ó 2) reesterificación (triglicéridos (Tg), fosfolípidos, colesterol esterificado, etc.). El balance entre la oxidación y la esterificación de los ácidos grasos en el hígado está controlado principalmente por los cambios nutricionales (flujo energético), los niveles de las hormonas insulina y glucagón entre otras, y la expresión y actividad de enzimas involucradas en estos procesos (activación de receptores nucleares).

### 1) Oxidación de ácidos grasos:

Los AG que ingresan al hepatocito pueden ser oxidados a nivel mitocondrial: “ $\beta$ -oxidación”. La enzima carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT 1) juega un rol clave en este proceso. Esta enzima se localiza en la membrana mitocondrial externa, es limitante en la oxidación de AG y cataliza la formación de acil-carnitina a partir de acil-CoA, primer paso del transporte de AG de cadena larga desde el citosol al interior de la matriz mitocondrial para su posterior oxidación (Ryu y Cha, 2003). La actividad CPT 1 se encuentra disminuida en estado post-prandial, mientras que se eleva en ayunas aumentando la oxidación de AG. Los niveles incrementados de malonil-CoA citoplasmáticas inhiben la actividad CPT 1, disminuyendo la entrada de AG al compartimento mitocondrial y por ende la  $\beta$ -oxidación (Stefanovi-Racic y col., 2008).

En los peroxisomas existe otra vía de  $\beta$ -oxidación, una enzima clave en este camino metabólico es la oxidasa de AG (FAO). Esta vía oxida fundamentalmente los AG de cadena larga (> a 20 carbonos). Algunas de las enzimas que participan en este camino son diferentes a las que participan en la oxidación mitocondrial, pero las etapas metabólicas son semejantes. La oxidación peroxisomal finaliza en AG de 8 átomos de carbono. La enzima FAO es altamente inducida por los ácidos grasos polinsaturados (PUFAs), ya que éstos son ligandos naturales de receptores nucleares- $\alpha$  activadores de la proliferación peroxisomal (PPAR- $\alpha$ ) que promueven su expresión génica (Jump y Clarke, 1999) (Sampath y Ntambi, 2005).

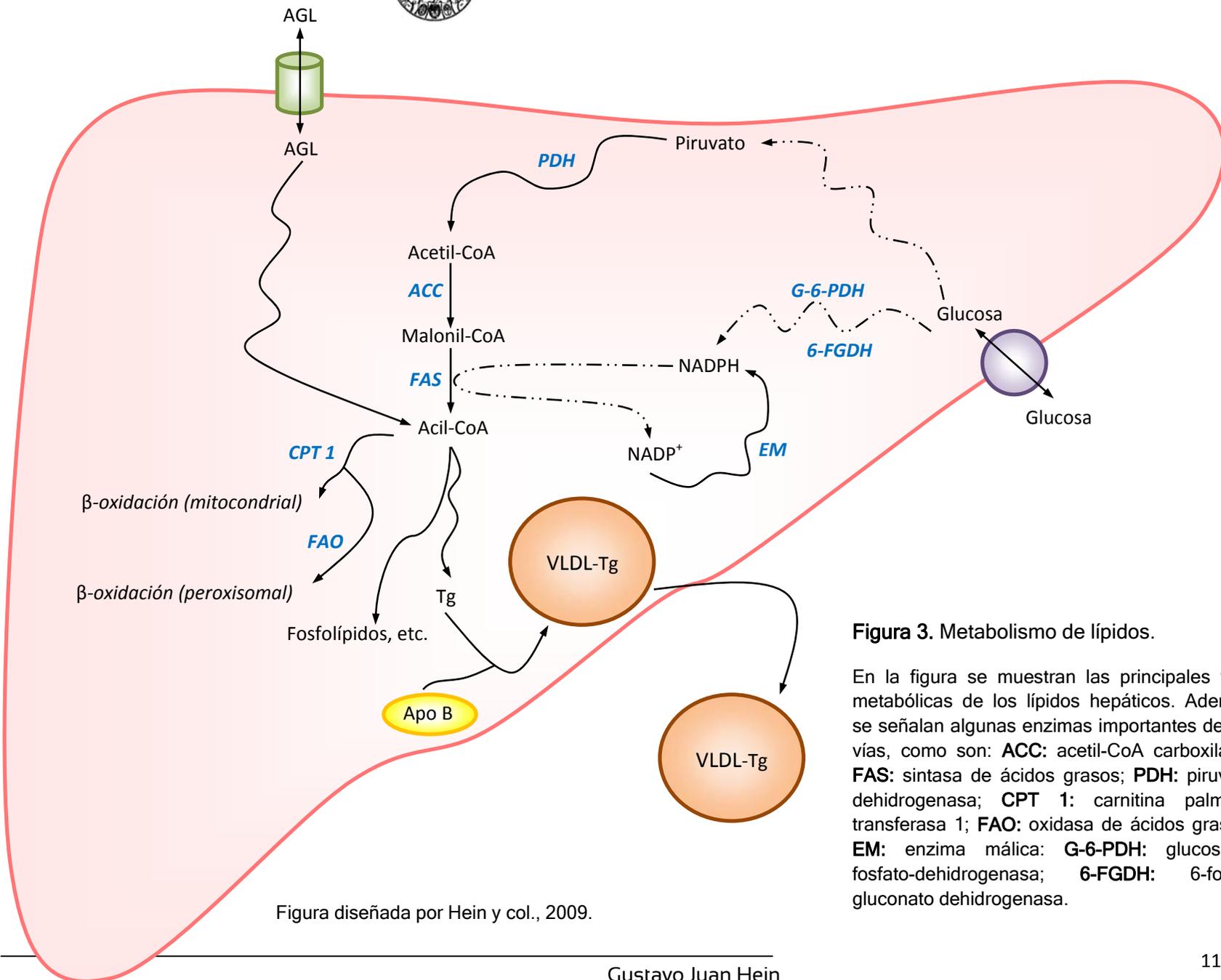


Figura diseñada por Hein y col., 2009.

**Figura 3.** Metabolismo de lípidos.

En la figura se muestran las principales vías metabólicas de los lípidos hepáticos. Además se señalan algunas enzimas importantes de las vías, como son: **ACC**: acetil-CoA carboxilasa; **FAS**: sintasa de ácidos grasos; **PDH**: piruvato dehidrogenasa; **CPT 1**: carnitina palmitoil transferasa 1; **FAO**: oxidasa de ácidos grasos; **EM**: enzima málica; **G-6-PDH**: glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa; **6-FGDH**: 6-fosfogluconato dehidrogenasa.



En ciertas condiciones metabólicas, relacionadas con un índice alto de oxidación de AG, el hígado produce cantidades considerables de cuerpos cetónicos (acetoacetato y 3-hidroxi-3-metilglutarato) que son exportados a la circulación. El acetoacetato continuamente se descarboxila de manera espontánea para dar acetona. Los cuerpos cetónicos son utilizados como fuente de energía por los tejidos extrahepáticos y son oxidados de modo proporcional a su concentración en la sangre (Chapman y col., 1973) (McGarry y col., 1975). La cetogénesis es controlada indirectamente por la enzima CPT 1, la cual mediante un aumento en la concentración de carnitina es capaz de inducir la cetogénesis hepática (McGarry y col., 1989) y directamente por la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa mitocondrial (HMG-CoAS). La HMG-CoAS se localiza tanto en el citosol como en la mitocondria; la citosólica produce HMG-CoA que luego es transformado a mevalonato por acción de la HMG-CoA reductasa, mientras que el HMG-CoA sintetizado en la mitocondria es transformado a acetoacetato por acción de la enzima HMG-CoA liasa. Cuando el pool de succinil-CoA se incrementa, como resultado de un aumento en el flujo de metabolitos glucogénicos, el grupo succinil se une a la subunidad reguladora de la HMG-CoAS mitocondrial inhibiéndola (Hegardt, 1999).

## 2) Síntesis de ácidos grasos y triglicéridos:

La síntesis lipídica conduce a la acumulación de lípidos celulares, ya sea a partir del acetyl-CoA (proveniente de la glucólisis o de la degradación de aminoácidos), de los AG captados por el hígado de la circulación o provenientes de las reservas de Tg del propio tejido (Desvergne y col., 2005). Esta reserva no es tan significativa en comparación con el tejido adiposo, pero parece ser una reserva local para las necesidades hepáticas. Actualmente se sabe que algunos lípidos son almacenados en unidades especializadas, consideradas como depósitos de lípidos neutros intracelulares, conocidos como "lipid droplets" (LDs) (Chang y Chan, 2007). Los LDs están conformados por un núcleo de lípidos neutros (principalmente Tg y/o colesterol) y rodeados por una monocapa fosfolipídica. Las funciones atribuidas a los LDs son variadas: actúan como reservorios energéticos, son fuente de lípidos para la biosíntesis de membranas y además cumplen con la importante función de almacenar lípidos potencialmente tóxicos para las células. Bell y col. (2008), señalaron la importancia de estas organelas por sus sorprendentes y complejas funciones para mantener la homeostasis lipídica. Al respecto, cuando hay un incremento de ácidos grasos no esterificados (AGNE o AGL) en el medio intracelular, las



células los almacenan como Tg en el interior de los LDs, modulando su concentración óptima para que no resulte perjudicial a la fisiología celular. Estas organelas son capaces de secuestrar o liberar AGNE para su  $\beta$ -oxidación ó para la síntesis de membranas, resultando cruciales para el apropiado funcionamiento celular.

El hígado puede hacer “**síntesis de novo**” de ácidos grasos (lipogénesis), a partir de sustratos no lipídicos (particularmente glucosa y aminoácidos), que son transformados en primera instancia a acetil-CoA. La estimulación de la lipogénesis hepática por la ingesta de carbohidratos, dependerá del tipo y cantidad en la dieta (Bizeau y Pagliassotti, 2005) (Basciano y col., 2005).

Una etapa clave que asocia el metabolismo de los carbohidratos con la lipogénesis, involucra al complejo piruvato dehidrogenasa (PDHc). Este complejo multienzimático comprende varias enzimas que operan secuencialmente, catalizan la reacción de descarboxilación del piruvato por oxidación a acetil-CoA en la mitocondria y tiene una gran importancia en la regulación de la lipogénesis en el tejido hepático (Da Silva y col., 1993). Para que estas unidades de acetil-CoA puedan ser utilizadas para la síntesis de ácidos grasos, estas deben estar presentes en el citoplasma. De modo tal que el acetil-CoA entra al citoplasma en la forma de citrato por medio del sistema de transporte del tricarboxilato. En el citoplasma el citrato se convierte en oxalacetato por la reacción catalizada por la ATP-citrato liasa. El oxalacetato resultante se convierte en malato por la malato deshidrogenasa (MDH). El malato producido en esta vía puede sufrir una descarboxilación oxidativa por la enzima málica (EM) (Wise y Ball, 1964). La coenzima para esta reacción es el  $\text{NADP}^+$  para generar NADPH. La ventaja de esta serie de reacciones para convertir el acetil-CoA mitocondrial en acetil-CoA citoplasmático, es que el NADPH que se produce por la reacción de la EM puede ser una fuente importante del co-factor reductor para la actividad de la sintasa de ácidos grasos (FAS). Por lo tanto, la magnitud de la lipogénesis depende no solo del aporte de sustratos lipogénicos sino también del aporte de los equivalentes reducidos NADPH.

La **síntesis de ácidos grasos** se origina a partir de acetil-CoA donde las enzimas acetil-CoA carboxilasa (ACC) y el complejo enzimático FAS son claves en este proceso. La acetil-CoA en la síntesis de las grasas se convierte en malonil-CoA por acción de la ACC. La malonil-CoA es un intermediario metabólico entre la lipogénesis y la  $\beta$ -oxidación. En los tejidos animales existen dos isoformas de ACC, distinguiéndose según la distribución en los tejidos y su rol fisiológico. En el hígado y tejido adiposo se expresa la



ACC de tipo 1 (ACC 1), también denominada ACC- $\alpha$ , la cual es una enzima citosólica y participa en la lipogénesis de novo (Postic y Girard, 2008). La ACC 2, además conocida como ACC- $\beta$ , se expresa principalmente en tejidos oxidativos (corazón y músculo esquelético), siendo un sensor del flujo metabólico en estos tejidos (Abu-Elheiga y col., 2001).

Con respecto a la síntesis de novo de ácidos grasos, los mecanismos involucrados en la regulación de la ACC hepática son principalmente alostéricos, covalentes y transcripcionales (Volpe y Vagelos, 1976) (Beatty y Lane, 1983). La insulina estimula la síntesis de ACC y el ayuno la disminuye (Majerus y col., 1969) (Nakanishi y Numa, 1970). Esta enzima es regulada negativamente por el glucagón y la adrenalina (Brownsey y Denton, 1982) (Witters y col., 1988).

Otra enzima que participa activamente en este proceso de síntesis es la FAS, que se encarga de la elongación del malonil-CoA hacia la formación del acil-CoA. Esta enzima se encuentra regulada principalmente a nivel transcripcional por los nutrientes y hormonas. En particular, la glucosa e insulina incrementan su actividad, mientras que el glucagón y AG saturados y polinsaturados la disminuyen. En el hígado, la insulina es capaz de activar a FAS incrementando su actividad enzimática, ARNm y su transcripción genética (Radenne y col., 2008). Clarke y col. (1990) demostraron que la abundancia del ARNm de FAS, en hígado de rata, varió según las condiciones dietarias. Por ejemplo, dietas ricas en PUFAs, disminuyeron los niveles hepáticos del ARNm de FAS inhibiendo su transcripción genética (Clarke, 1993).

Finalmente los ácidos grasos sintetizados en forma endógena o los que arriban al tejido por la circulación son esterificados para la **síntesis de lípidos** (fosfolípidos, triglicéridos, etc.). Para ello, son activados a acil-CoA por la enzima acil-CoA sintasa en el camino que conduce a la síntesis de Tg, este proceso es catalizado por las enzimas: glicerol-3-fosfato-aciltransferasa, 1-acilglicerol-3-fosfato-aciltransferasa, la fosfatidato fosfohidrolasa y la enzima diacilglicerol-aciltransferasa (DAGT). Esta última se localiza en la membrana del retículo plasmático (Igal y col., 2001) (Yu y col., 2002) y hasta el presente no se conocen exactamente los mecanismos de su regulación enzimática (Postic y Girard, 2008).

Los triglicéridos almacenados en el hígado son secretados a la circulación formando parte de las partículas lipoproteicas VLDL. Las apoproteínas B100 (Apo B100) y



B48 (Apo B48 -en ratas) necesarias para este proceso, son utilizadas en el retículo endoplasmático rugoso e incorporadas a las lipoproteínas en el retículo endoplasmático liso. Luego de dirigirse en vesículas de transporte hacia el aparato de Golgi, las lipoproteínas son glicosiladas y migran hacia la membrana sinusoidal del hepatocito fusionándose con ella para luego ser secretadas por pinocitosis inversa a la circulación como moléculas de VLDL nacientes ricas en Tg que además poseen fosfolípidos, colesterol libre y esterificado y algo de Apo E y Apo C. Las VLDL nacientes para poder ser delipidadas requieren tomar mas Apo E y Apo C de las moléculas HDL y así transformarse en VLDL maduras (Adeli y col., 2001). Durante el camino de su degradación, la VLDL nunca pierde la Apo B100 y la hidrólisis progresiva de sus Tg conduce a una cascada de partículas esféricas cada vez más pequeñas (IDL → LDL). Mientras esto sucede, lípidos de las monocapas de superficie son transferidos a la HDL. Es decir, las VLDL se sintetizan como partículas muy ricas en Tg, perdiendo parcialmente el contenido de este lípido y aumentando en relación a su contenido en colesterol.

Se ha sugerido que en varias especies, la cantidad de Tg secretados por el hígado resulta proporcional a su capacidad de sintetizar AG “de novo”. Por lo tanto, la concentración plasmática de AGNE, jugaría un rol importante en la inducción de la esterificación hepática y producción de VLDL-Tg. Si bien los AGNEs que arriban al hepatocito juegan un rol importante en la regulación de la síntesis de VLDL-Tg, es el estado nutricional y hormonal del organismo el que condiciona finalmente la velocidad de secreción de VLDL. Los factores nutricionales y hormonales determinan los caminos preferenciales de los AG: oxidación, almacenamiento o secreción. Ante una situación de insulino resistencia, con una mayor disponibilidad hepática de AGNE plasmáticos e incrementada lipogénesis de novo, los hepatocitos priorizan el camino de esterificación de los AG con el consecuente aumento de secreción de VLDL-Tg (Lewis, 1997) (Lewis y col., 2002).



### 1.2.1. Regulación de enzimas claves involucradas en el metabolismo lipídico.

Se pueden diferenciar tres tipos de control de la regulación metabólica: 1) corresponde al clásico control alostérico, donde se activa una determinada enzima de cualquier vía metabólica, por la unión de un activador que generalmente resulta ser el propio sustrato (ej. ACC); 2) involucra una serie de modificaciones post-translacionales tales como proteólisis, fosforilación, glicosilación, etc., pudiendo variar el equilibrio entre la enzima activa e inactiva o afectar la estabilidad de la proteína (un ejemplo es la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH)); y 3) comprende la regulación transcripcional que afecta los niveles de expresión de las enzimas, pudiendo afectar el control de la homeostasis metabólica. En el segundo y tercer tipo de regulación los niveles hormonales cumplen un rol muy importante.

El control transcripcional requiere señales específicas que sean traducidas en el núcleo celular y que definan los genes que deben intervenir (Desvergne y col., 2006). En general, la mayoría de los factores de transcripción están involucrados de alguna manera en la regulación metabólica. Sin embargo, a continuación se detallan algunos receptores que están implicados en el control de enzimas importantes del metabolismo de lípidos y cuyos efectos se vieron asociados a cambios nutricionales (Jump y Clarke, 1999) (Li y Glass, 2004) (Sampath y Ntambi, 2005). Los receptores nucleares actúan como factores de transcripción y se caracterizan por tener dos propiedades importantes: a) son activados luego de su unión con ligandos específicos, y b) se unen a elementos de respuesta localizados en las cercanías de los promotores de genes en los cuales actuarán. Algunos de los principales receptores involucrados en la homeostasis lipídica en el hígado son: receptor alfa activador de la proliferación peroxisomal (PPAR- $\alpha$ ), proteína-1c que une elementos reguladores de esteroides (SREBP-1c) y receptor X hepático alfa (LXR- $\alpha$ ).

#### 1.2.1.1. Receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPARs).

Los receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPARs), son miembros de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas, de factores de transcripción activados por ácidos grasos y eicosanoides derivados de estos últimos (Li y Glass, 2004). Hasta la fecha se han identificado tres isoformas de PPARs:  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  y  $\gamma$ ; las cuales son consideradas en la actualidad, piezas claves en la regulación del metabolismo lipídico, la



presión arterial y en los procesos fisiopatológicos que subyacen en la sensibilización a la insulina y a la inflamación (Sampath y Ntambi 2005).

La activación de los PPARs conduce a la formación de heterodímeros con los receptores retinoides X (RXRs). Los complejos moleculares PPAR/RXR se unen a secuencias específicas del ADN, conocidos como elementos de respuesta a los proliferadores de peroxisomas (PPER), dando lugar a la estimulación o a la disminución de la respuesta de los genes correspondientes. La distribución tisular de las tres isoformas de PPAR, les confiere selectividad funcional específica y diversos grados de sensibilidad frente a los ligandos y coactivadores que intervienen en el proceso de activación génica como resultado de su estimulación.

PPAR- $\alpha$  es el subtipo que se encuentra mayoritariamente expresado en hígado y está involucrado en la regulación genética del metabolismo lipídico (Jump, 2002). Esto incluye el transporte de AG a través de la membrana celular, uniones intracelulares de proteínas hepáticas, activaciones vía formación de acil-CoA y catabolismos como la  $\beta$ -oxidación peroxisomal y mitocondrial (Desvergne y col., 2006). Los fibratos tales como el clofibrato y el WY14643 son activadores potentes del PPAR- $\alpha$ . Los PUFAs son ligandos naturales de los PPARs, en general los AG de las familias n-3 y n-6 tienen la capacidad de activarlos y ejercer sus efectos sobre la expresión de un gran número de genes que codifican enzimas tales como: FAO (Berthou y col., 1995), CPT 1 (Brandt y col., 1998), ACC, FAS, L-PK, G-6-PDH, las desaturasas  $\Delta$ -5,  $\Delta$ -6 y esteroil-CoA desaturasa-1 (SCD-1) que es una isoforma de la desaturasa  $\Delta$ -9 presente en el hígado (Miller y Ntambi, 1996). Sin embargo numerosos investigadores, empleando un modelo murino sin expresión del PPAR- $\alpha$ , sugirieron que los efectos de los PUFAs sobre la oxidación y síntesis lipídica, no estaba mediada por un factor de transcripción en común (ej. PPAR- $\alpha$ ). Esto condujo a la búsqueda e identificación de otro factor transcripcional como es el SREBP (Sampath y Ntambi, 2005).



### 1.2.1.2. Proteínas que unen elementos reguladores de esteroides (SREBPs).

Los SREBPs son factores de transcripción que pertenecen a una gran familia cuyas estructuras características son las llamadas “dedos de zinc”. Hasta el momento, existen tres isoformas identificadas de SREBPs: SREBP-1a y 1c, que son importantes en la regulación de los genes relacionados con la síntesis de lípidos y la isoforma SREBP-2, que es capaz de controlar los genes inherentes a la homeostasis del colesterol. SREBP-1c se halla expresada mayoritariamente en el hígado de roedores y humanos, y es reconocida en la actualidad por su intervención en la regulación de la síntesis de Tg y AG (Osborne, 2000).

SREBP-1c es sintetizada como molécula precursora y se encuentra anclada en el retículo endoplasmático y en las membranas nucleares. Luego del clivaje proteolítico, la forma madura activa migra hacia el núcleo donde se une a los elementos de respuesta a esteroides y a secuencias denominadas “E-boxes”. Los factores que controlan el clivaje de la forma precursora de SREBP-1c no se conocen aún. La insulina puede ejercer su acción sobre SREBP-1c de tres diferentes maneras: incrementando su transcripción, induciendo su movilización hacia el núcleo o activando su actividad transcripcional (Foretz y col., 1999). Matsumoto y col. (2003) demostraron en hígado de ratones, la intervención de la proteína quinasa C  $\lambda$  (PKC  $\lambda$ ) en la inducción-insulina dependiente de la expresión del SREBP-1c. En el hígado de estos ratones, con el gen PKC  $\lambda$  “knock out”, el contenido de Tg se vio disminuido y se redujo la expresión del SREBP-1c, además de incrementarse la sensibilidad insulínica.

### 1.2.1.3. Receptores X hepáticos (LXRs).

Los LXRs son receptores nucleares que mediarían la regulación genética de los AG, cuyos activadores endógenos son los oxisteroides y los derivados del metabolismo del colesterol (Yoshikawa y col., 2003) (Li y Glass, 2004).

Los dos isotipos que han sido más caracterizados son: el LXR- $\alpha$ , que se expresa en mayor medida en el hígado pero que además se lo puede encontrar en riñón, intestino y tejido adiposo; y el LXR- $\beta$ , que se expresa en forma ubicua. Los LXRs actúan como



heterodímeros con RXR para poder unirse a los elementos de respuesta ubicados en la zona promotora del ADN (LXRE) (Peet y col., 1998).

Los LXRs, al unirse a sus ligandos naturales (oxiesteroles), afectan a una variedad de genes de importantes enzimas involucradas en el metabolismo lipídico incluyendo: HMG-CoA reductasa, 7- $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1), LPL, FAS, ACC, SCD-1 y el factor de transcripción SREBP-1c (Repa y col., 2000) (Lu y col., 2001). Los PUFAs inhiben la acción de los LXRs a través de varios mecanismos; uno de ellos sería a través de la unión competitiva de los PUFAs con el LXR previniendo la interacción de los oxiesteroles con este último (Sampath y Ntambi, 2005).

Por otro lado, Yoshikawa y col. (2003) demostraron en hepatocitos aislados de ratones, que el PPAR- $\alpha$  redujo la unión del heterodímero LXR- $\alpha$ /RXR a LXRE del ADN. Esto sugiere que la activación del PPAR- $\alpha$ , podría inhibir la vía LXR- $\alpha$ /SREBP-1c a través de la reducción en la formación del complejo LXR- $\alpha$ /RXR, poniendo en evidencia una interacción clave entre el LXR- $\alpha$  y PPAR- $\alpha$  en la homeostasis lipídica.

En resumen, el metabolismo lipídico en el hígado es un proceso altamente coordinado, en el cual varias vías se encuentran reguladas por receptores nucleares y factores de transcripción. Además, no solo se encuentra controlado directamente por los niveles y composición intracelular de AGNE, sino también por otros metabolitos y factores hormonales (ej. carbohidratos, insulina, etc.). A pesar de la complejidad y el grado de coordinación de esta maquinaria, un incremento desmedido de cualquier metabolito y/o la alteración de los receptores nucleares que censan estas variaciones, podrían conducir al deterioro de este órgano con las subsecuentes patologías (Nguyen y col., 2008).

### 1.3. Cascada de señalización de la insulina.

Como mencionamos anteriormente la insulina cumple una función vital que resulta esencial para el normal crecimiento y desarrollo del organismo, así como también la homeostasis de glucosa, grasas y metabolismo de proteínas. Durante décadas, numerosos investigadores han tratado de dilucidar los eventos intracelulares que se suscitan luego de la activación del receptor de insulina (IR). El entendimiento de la cascada de señalizaciones involucrada en la acción insulínica, podría conducir a un mejor entendimiento sobre la fisiopatología de la insulino resistencia asociada con obesidad y



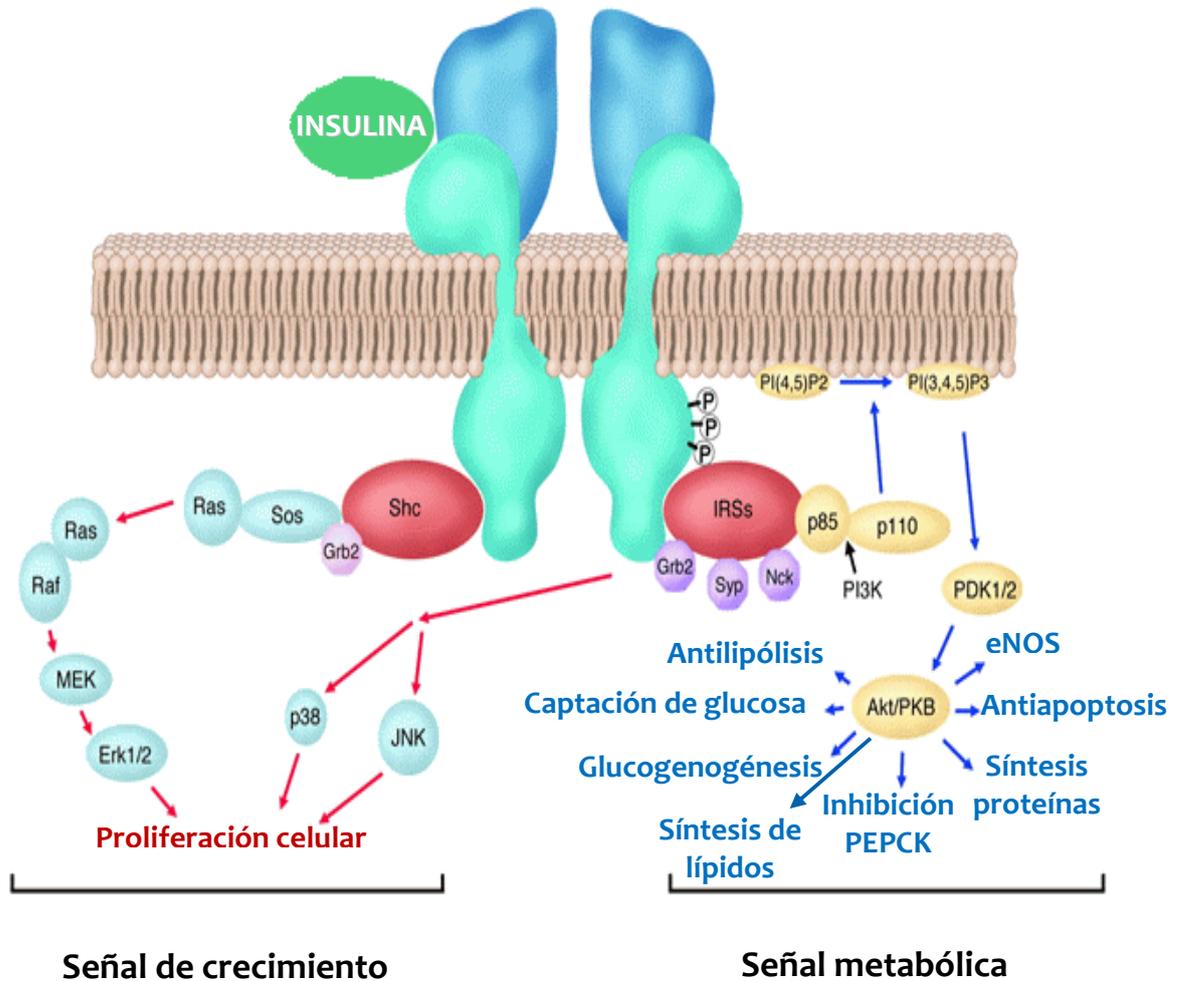
diabetes tipo 2. La identificación de las moléculas claves involucradas en este proceso, facilitaría el estudio de agentes terapéuticos efectivos para el tratamiento de los mencionados desórdenes (Roith y Zick, 2001).

La insulina circulante alcanza rápidamente el tejido “blanco”, donde interactúa con su receptor. El IR es una tirosina-quinasa transmembrana, cuya configuración es tetramérica:  $\alpha 2/\beta 2$  (Ebina y col., 1985). Luego de la unión de la insulina con su receptor se origina una autofosforilación inmediata que conduce a una cascada de fosforilaciones de varios sustratos intracelulares, incluyendo la familia de las proteínas “sustratos receptor de insulina” (IRSs). Los IRSs poseen un dominio homólogo conservado (PH), localizado en la porción amino-terminal, que les permite aproximarse al receptor. Además contienen un dominio carboxilo-terminal (PTB) en la región PH, que permite interactuar con los residuos de tirosinas fosforiladas del receptor. Los dominios PTB de los sustratos receptores de insulina 1 y 2 (IRS-1 e IRS-2) comparten un 75% de homología en su secuencia, mientras que la región carboxilo-terminal resulta pobremente conservada y contiene múltiples sitios de fosforilación de tirosinas que sirven como sitios de unión a dominios SH2, los cuales a su vez contienen proteínas como la subunidad regulatoria  $\alpha p85$  de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) que es uno de los mediadores de la acción de la insulina (White, 1998). La estimulación del receptor de insulina conduce a la activación de dos vías principales: 1) cascada de la “proteína quinasa activada por mitógeno” (MAP) y 2) vía de PI3K, que ha sido estudiada ampliamente en el contexto de la respuesta metabólica a la insulina (Saltiel y Kahn, 2001) (**Figura 4**).

La insulina tiene diferentes efectos que incluyen entre otros: el estímulo de la síntesis de glucógeno e inhibición de su degradación, la inducción de la glucólisis y la inhibición de la gluconeogénesis hepática; la supresión de la lipólisis del tejido adiposo y la estimulación de síntesis de lípidos; la modulación de adipocitoquinas; la inhibición de la secreción de glucagón y señalización en el hipotálamo (Ader y Bergman, 1990) (Muse y col., 2004) (Girard, 2006).



**Figura 4.** Representación esquemática de las dos principales vías que intervienen en la cascada de señales de la insulina.



(Van den Berghe, 2004 - Fig. modificada)

La unión de la insulina a su receptor resulta en la autofosforilación del receptor en residuos de tirosina y en la fosforilación posterior de proteínas intracelulares, entre los que se cuenta la quinasa dependiente de fosfatidilinositol (PI3K). Esta a su vez activa a PKB/Akt, una serina/treonina proteína-quinasa que participa en numerosos procesos metabólicos: antiproliferación, antiapoptosis, síntesis proteica, etc. Otra vía de transducción activada por la insulina es la cascada que incluye Ras, Raf y MEK, lo que lleva a la activación de proteína-quinasas activadas por mitógenos (ERK 1/2) y a la proliferación celular.



## 2. SÍNDROME METABÓLICO.

En la población mundial del nuevo milenio se ha observado un crecimiento explosivo de obesidad, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, etc., como resultado del cambio producido en el estilo de vida (sedentarismo y los factores nutricionales) (Houston y Egan, 2005).

El “Síndrome X” o “Síndrome Metabólico”, representa un síndrome multifacético caracterizado por una constelación de anomalías metabólicas, de elevada incidencia en la población mundial, que incluyen entre otras: intolerancia a la glucosa, dislipidemia, hipertensión, obesidad central o intra-abdominal, insulino resistencia y mayor riesgo al padecimiento de diabetes tipo 2 (Reaven, 2000). Todos ellos representan factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares (Cheal y col., 2004). La resistencia a la insulina constituye un rasgo temprano y fundamental dentro del grupo de los desórdenes mencionados anteriormente (Enriquez, 2002).

La morbimortalidad asociada a estas patologías es un problema considerable desde el punto de vista humano y socioeconómico. Consecuentemente, resulta de gran interés para los investigadores básicos y clínicos lo que atañe al conocimiento de los mecanismos involucrados en la etiología y el desarrollo de la enfermedad, tanto para su prevención como para su tratamiento.

A nivel experimental existen numerosos modelos animales genéticos, farmacológicos y nutricionales de dislipidemia, diabetes no insulino dependiente, resistencia insulínica y adiposidad visceral que se utilizan para analizar los mecanismos involucrados en este síndrome. Mencionaremos a continuación algunos de ellos:



## 2.1. MODELOS EXPERIMENTALES.

### 2.1.1. Modelos experimentales genéticos de dislipemia, resistencia insulínica y diabetes tipo 2 asociada a obesidad.

#### **Rata obesa Zucker (ZDF):**

Este modelo presenta una mutación autosómica recesiva designada como “*fa*”, el cual codifica para el receptor de la leptina y conlleva a una anormal señalización, atribuyéndole una resistencia insulínica asociada a obesidad (Peterson y col., 1990). La presencia homocigota de dicha mutación desarrolla hiperfagia y obesidad extrema, acompañada de hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperlipidemia y resistencia insulínica (Penicaud y col., 1987) (Galante y col., 1994). La diabetes tipo 2 en los machos de este modelo se desarrolla en la séptima y la décima semana de vida, pasando por un estado de prediabetes a diabetes caracterizado por hiperinsulinemia basal y disminución de la secreción de insulina bajo el estímulo de la glucosa.

#### **Rata OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty):**

Se caracteriza por la manifestación de sobrepeso temprano asociado a hiperinsulinemia. Estos animales desarrollan espontáneamente hiperglucemia, hiperplasia de los islotes pancreáticos y finalmente la aparición de complicaciones renales a partir de la decimoctava semana de vida. Y en la semana cuarenta se convierten en insulino-dependientes que les ocasiona una pérdida de peso progresiva, poliuria, hiperglucemia agravada y una disminución en la insulinemia (Kawano y col., 1992). Por otro lado el tejido adiposo de estas ratas muestra un incremento en la expresión de la proteína PPAR y del SREBP.

#### **Rata JCR LA cp (corpulenta):**

Estos animales presentan una mutación autosómica recesiva en el gen “*cp*” (denominado comúnmente “corpulento”), heredado espontáneamente a partir de ratas hipertensas -SHR- (Russell y col., 1986). En líneas generales, los machos homocigotas desarrollan espontáneamente lesiones cardiovasculares con hipertensión (Greenhouse y



col., 1991). Además presentan obesidad, hiperlipidemia e insulino resistencia. Resulta un modelo de gran interés para el estudio de aterosclerosis.

#### **Ratón ob/ob:**

Estos ratones presentan una mutación puntual en el gen “ob” que codifica la información para la transcripción y traducción de la hormona leptina (Martin y col., 1973). La obesidad que presenta este modelo es causada por la deficiencia que presenta el gen “ob” y puede ser corregida por la administración del péptido. Los ratones desarrollan un síndrome diabético moderado que incluye obesidad, hiperinsulinemia y moderada hiperglucemia (Herberg y Coleman, 1977).

#### **Ratón db/db:**

En este caso, los ratones presentan una mutación puntual en gen autosómico recesivo “db” que codifica para el receptor de leptina (Kobayashi y col., 2000). Cuando la mutación se encuentra presente en forma homocigota en ratones de la cepa C57BL/6J, éstos desarrollan hiperglucemia moderada. Pero, por el contrario, si se presenta en ratones de la cepa C57BL/Ks la expresión es mayor y desarrolla un síndrome de obesidad, resistencia insulínica, severa hiperglucemia y una importante disfunción en los islotes pancreáticos (Kaku y col., 1989).

### **2.1.2. Modelos experimentales de dislipemia, resistencia insulínica y anormal homeostasis a la glucosa por manipulaciones nutricionales.**

#### **Rata del desierto (*Psammomys obesus*):**

Estos animales habitan naturalmente la zona de África del Norte y el Medio Oriente, donde al alimentarse con su dieta vegetariana con bajo contenido en calorías, desarrollan un peso corporal normal y presentan normoglucemia y normoinsulinemia (Marquière y col., 1991). Por el contrario en cautiverio, al consumir dieta estándar de laboratorio se vuelven obesas, hiperglucémicas, hiperinsulinémicas y con resistencia a la



insulina ya que presentan bajo número de receptores de insulina. Además, cuando se las someten a dietas especialmente suplementadas (ej. con colesterol) pueden desarrollar lesiones cardiovasculares, representando un modelo interesante para el estudio de diabetes asociada a aterosclerosis por tratamiento dietario y drogas (Mathe, 1995) (Shafir y col., 1999).

#### **Modelo dieta rica en grasas saturadas:**

Este modelo se basa en la administración a roedores de una dieta rica en grasas saturadas (más del 60 % de la energía total). Esto puede inducir resistencia insulínica en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo que se socia a una dislipidemia, anormal homeostasis a la glucosa y obesidad (Storlien y col., 1986) (Kraegen y col., 1986). En el tejido adiposo se observó una disminución en la masa proteica del sustrato receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1, IRS-2) acompañado de una menor expresión génica a nivel de ARNm del transportador de glucosa GLUT4 (Pedersen y col., 1991) (Sevilla y col., 1997). También en músculo esquelético se vio una alteración en las primeras secuencias de la señal insulínica a nivel de la fosforilación de las tirosinas del IRS-1 y en la actividad de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (Bell y col., 2000) (Taouis y col., 2002).

#### **Modelo de dietas ricas en hidratos de carbono:**

Se basa en la administración de una dieta rica en hidratos de carbono simples (sacarosa, fructosa, etc.) en forma crónica a roedores normales. De esta manera se puede observar una resistencia insulínica acompañada de dislipidemia y anormal homeostasis de la glucosa (Reaven y col., 1979) (Lombardo y col., 1983) (Gutman y col., 1987) (Pagliassotti y col., 1996).



### 2.1.3. Descripción del modelo Dieta rica en sacarosa (DRS).

Laube y col. (1973) observaron diferencias en los efectos metabólicos producidos por la ingesta de azúcares complejos (almidón), disacáridos (sacarosa) o monosacáridos (glucosa y fructosa). Estos estudios, mostraron niveles de Tg y AGNE plasmáticos elevados en ratas alimentadas con DRS o con mezcla de cantidades equivalentes de glucosa y fructosa, en comparación a los animales que habían recibido almidón durante el mismo tiempo. Más tarde, Reaven y col. (1979) observaron en ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa, una serie de anormalidades metabólicas que incluían hiperinsulinemia, incrementada secreción hepática de VLDL-Tg y concentraciones elevadas de Tg plasmáticos.

Al igual que otros investigadores (Vrāna y Kazdova, 1986) (Reaven, 1984), estudios de nuestro grupo (Lombardo y col., 1983) (Gutman y col., 1985) (Chicco y col., 1991) (Bernal y col., 1995), demostraron que ratas Wistar normales jóvenes alimentadas con una DRS durante 3 a 5 semanas desarrollaban hipertrigliceridemia, mayor secreción hepática de VLDL-Tg, menor remoción plasmática de Tg, elevados niveles de AGNE plasmáticos, anormal homeostasis a la glucosa, hiperinsulinemia y alterada sensibilidad insulínica global (clamp euglucémica-hiperinsulinémica).

Además, Gutman y col. (1987) demostraron que ratas alimentadas con DRS durante un período largo de tiempo, desarrollan alteraciones metabólicas caracterizadas en tres periodos secuenciales. Luego de 3-5 semanas de DRS (Período de inducción) se observa: normoglucemia e hiperinsulinemia, dislipidemia (incremento de Tg y AGNE plasmáticos). Si se continúa la dieta se constata una normalización espontánea de los parámetros mencionados anteriormente, al cabo de las 5 a 8 semanas de ingesta (Período de Adaptación). Finalmente la dislipidemia, acompañada de moderada hiperglucemia, normoinsulinemia y resistencia insulínica (RI) periférica global, reaparecen a las 13 semanas permaneciendo estable hasta al menos las 40 semanas de ingesta (Período de Recurrencia). Estos hallazgos nos muestran que un perfil metabólico y hormonal diferente acompaña a la hipertrigliceridemia con la cronicidad de la dieta.

La sensibilidad insulínica periférica global se encuentra reducida a las 3-5 semanas y se deteriora notablemente luego de las 13 semanas. En islotes perifundidos, el patrón bifásico de secreción de insulina bajo el estímulo de la glucosa, evoluciona mostrando un significativo incremento del primer pico (hipersecreción de insulina) con una segunda fase normal (en el Período de Inducción), a ausencia del primer pico con una segunda fase



hipersecreta luego de 30-40 semanas de ingesta (Período de Recurrencia) (Chicco y col., 2000). Al cabo de este tiempo, el páncreas endócrino muestra un incremento significativo del número y área de las células  $\beta$  sin cambios en la concentración de Insulina Inmunoreactiva (IRI) (Lombardo y col., 1996a).

Los niveles de AGNE plasmáticos, están determinados por las velocidades relativas de lipólisis de los depósitos grasos (tejido adiposo) y la captación y utilización de los mismos por los tejidos periféricos. En situaciones de resistencia insulínica y con antelación al desarrollo de la diabetes tipo 2, el tejido adiposo presenta un mayor y anormal depósito de Tg acompañado de un incremento de la actividad lipolítica (mayor liberación de AGNE) con una disminución de la acción antilipolítica de la insulina. Se ha propuesto que el aumento en el contenido de Tg y acil-CoA en tejidos sensibles a la insulina de pacientes obesos o insulino resistentes, junto a una mayor lipólisis del tejido adiposo, son condiciones que caracterizan a la resistencia insulínica y son detectadas antes del desarrollo de hiperglucemia en ayunas (Lewis y col., 2002).

En presencia de un incremento de AGNE plasmáticos, Reaven (1988) señaló que una mayor utilización hepática de AGNE sería un mecanismo fisiopatológico central responsable del desarrollo de la hiperglucemia en humanos. Aún más, una modulación aguda del metabolismo de AGNE "in vivo" en humanos con diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID) y en modelos experimentales de dislipemia y resistencia insulínica (RI) (ej. ratas con RI por dietas ricas en sacarosa o fructosa), ya sea directa por inhibición de la lipólisis o indirectamente por inhibición de la oxidación de AGNE, o ambos, reducen los niveles de glucosa sin cambios notables en la insulinemia (Lombardo y Chicco, 2006).

Chunli y col. (2002) demostraron que niveles de AGNE plasmáticos elevados, conducen a un incremento de acil-CoA y diacil-glicerol (DAG) en músculo esquelético de ratas. Esto se asoció con una activación de la PKC  $\theta$  y una reducción en la fosforilación de la tirosina del sustrato IRS-1 y de la masa del IRS-1 asociado con la actividad de la PI3K, alterando el transporte de la glucosa bajo el estímulo de la insulina. Trabajos de nuestro grupo demostraron en ratas alimentadas con DRS un progresivo deterioro de las vías oxidativas y no oxidativas de la glucosa, siendo el contenido de acil-CoA de cadena larga en músculo y de acil-CoA y Tg en corazón, las manifestaciones más tempranas del disturbio del metabolismo lipídico en estos tejidos (Chicco y col., 2003; Chicco y col., 1994).



Como se mencionó anteriormente a nivel hepático las dietas ricas en sacarosa inducen una mayor secreción de VLDL-Tg y acúmulo de Tg (Lombardo y Chicco, 2006). Otros autores además de lo antedicho observaron una disminución de la acción insulínica sobre la salida hepática de glucosa en ratas alimentadas con DRS durante un período muy corto de tiempo (1 semana) (Bizeau y Pagliassotti, 2005). Bezerra y col. (2000) constataron una reducción de la fosforilación del IRS-1 sin modificaciones de los niveles basales en el hígado de ratas alimentadas con fructosa durante 4 semanas.

Los resultados hasta aquí expuestos demostraron las modificaciones bioquímicas-metabólicas inducidas por una dieta rica en sacarosa/fructosa cuando ésta es administrada a ratas normales por cortos períodos de tiempo (3-5 semanas). Sin embargo los importantes cambios del medio metabólico hormonal -previamente descritos en este modelo- cuando la ingesta se prolonga en el tiempo (30-40 semanas), nos indujo analizar posibles mecanismos involucrados a nivel hepático en el deterioro de la dislipidemia y RI.

Numerosos estudios e investigaciones clínicas se han enfocado en el metabolismo de los ácidos grasos polinsaturados (PUFAs). El mayor interés por el consumo de los PUFAs aportados a la dieta, radica en los efectos beneficiosos que ejercen, tales como regulación de los niveles lipídicos, funciones cardiovasculares e inmunológicas, etc. (Harris y col., 1997) (Mori y col., 2000) (Kris-Etherton y col., 2002) (Connor, 2000) (Hwang, 2000), en individuos normales como también en humanos que padecen enfermedades crónicas. Los ácidos grasos PUFAs n-3 de origen marino pueden mejorar o prevenir la degeneración vascular aterosclerótica (Kinsella y col., 1990), enfermedades coronarias, dislipidemia, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 2, resistencia insulínica, hipertensión, etc. (Simopoulos y col., 1999) (Storlien y col., 1991).

Los dos ácidos grasos polinsaturados n-3 más comunes son: ácido eicosapentaenoico (EPA 20:5, n-3) y docosahexaenoico (DHA 22:6, n-3) que abundan en los peces, ostras y animales marinos y escasean o están ausente en animales y plantas terrestres (Din y col., 2004). El DHA representa un componente vital de los fosfolípidos de las membranas celulares (especialmente en cerebro y retina), y resulta necesario para el óptimo funcionamiento de estos tejidos (Jump, 2002a).

Existen trabajos en donde se demuestra que dietas con aceite de pescado resultaron ser efectivas en el descenso de los triglicéridos plasmáticos y en la concentración de VLDL en animales experimentales y en hombres normales e



hipertrigliceridémicos, atribuyéndoles un rol preventivo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Harris, 1989) (Herzberg y Rogerson, 1988).

La administración simultánea de aceite de pescado (rico en n-3 -como fuente de grasa dietaria) durante 3 semanas, a ratas normales alimentadas con DRS, previno el desarrollo de dislipidemia y resistencia insulínica (Lombardo y Chicco, 2006).

Halvorsen y col. (2001) demostraron que la administración de aceite de pescado (rico en 20:5 y 22:6 n-3) a ratas normales durante un corto plazo de tiempo, incrementó las actividades carnitina palmitoil transferasa 2 (CPT 2) y oxidasa de ácidos grasos (FAO) en el hígado. La enzima carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT 1) también aumentó su actividad, tanto en presencia como en ausencia de malonil-CoA, por los n-3 PUFAs dietarios. Además los n-3 PUFAs estimularon la expresión y actividades de las enzimas implicadas en la  $\beta$ -oxidación peroxisomal (incremento de FAO).

Neschen y col. (2002) han demostrado que el aceite de pescado n-3 dietario administrado a ratas durante corto plazo de tiempo, incrementó la capacidad oxidativa hepática a través de la habilidad para funcionar como ligando activador de los PPAR- $\alpha$ , y por este medio inducir la transcripción de genes relacionados con enzimas de la oxidación de AG. El ácido graso 20:5 n-3 CoA, no es un sustrato adecuado (menor afinidad) para la enzima diacilglicerol-acil-transferasa en comparación con el 18:1 n-6 CoA (Berge y col., 1999). Por lo tanto, disminuye la conversión del 20:5 n-3 en lípidos neutros (Tg). Los niveles más elevados intracelulares de estos ácidos grasos serían suficientes para inducir la activación del PPAR- $\alpha$  (Jump, 2002a).

Los ácidos grasos n-3, actuarían como mediadores importantes de los eventos nucleares que gobiernan la expresión de genes específicos involucrados en el metabolismo de los lípidos y la glucosa. Esta acción la realizarían vía activación de los factores de transcripción como PPARs y SREBPs (Jump, 2002b). Sin embargo la activación de éstos sería selectiva dependiendo del tipo de PUFAs, ya que en hepatocitos aislados, EPA mostró ser un activador más potente del PPAR- $\alpha$  que el ácido araquidónico (AA) (Ren y col., 1997).

Más aún, un estudio en ratones con el gen PPAR "knock out" mostró claramente que la regulación genética en el tejido hepático, por la administración de aceite de pescado rico en n-3, involucra dos vías diferentes: PPAR- $\alpha$ -dependiente y otra PPAR- $\alpha$ -independiente (Pan y col., 2000). Las enzimas de la oxidación peroxisomal como



microsomal mostraron ser dependientes y “up-reguladas” por el PPAR- $\alpha$ , mientras que las implicadas en la síntesis fueron independientes y “down-reguladas” por el PPAR- $\alpha$  (Ren y col., 1997). Esto indica que la regulación por los ácidos grasos sobre la lipogénesis “de novo” como la oxidación de ácidos grasos, no estaría mediada por un factor en común (ej. PPAR- $\alpha$ ).

Kim y col. (1999), alimentando ratones de la cepa C57BL/6J tanto con aceite de girasol como aceite de pescado durante 5 meses, demostraron que el aceite de pescado disminuyó los niveles del ARNm del SREBP-1c. La disminución de la forma madura de SREBP-1c en estos ratones, por la administración de aceite de pescado rico en n-3, “down-reguló” la expresión de genes hepáticos dependientes de SER tales como: receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL), 3-hidroxi-metil glutaril-CoA reductasa, 3-hidroxi-metil glutaril-CoA sintasa, ACC y estearoil-CoA desaturasa-1 (SCD-1). Esto sugiere que el aceite de pescado es capaz de disminuir la forma madura de SREBP-1 en el hígado, mediante el descenso de su expresión (ARNm), que se traduce en una disminución de la expresión de enzimas colesterogénicas y lipogénicas (Xu y col., 1999).

Además, Yoshikawa y col. (2003) demostraron en hepatocitos aislados, una disminución en la actividad del promotor SREBP-1c en función al siguiente orden de PUFAs: AA > EPA > DHA > ácido linoleico. El mecanismo propuesto por estos investigadores, sería que la activación de los PPAR- $\alpha$  por los PUFAs, suprimiría la interacción LXR/SREBP-1c, a través de la reducción de la formación del heterodímero LXR/RXR por su competencia con el RXR, y de esta manera inhibiría la expresión de genes involucrados en la vía lipogénica por inhibición de la activación del SREBP-1c.

Si bien SREBP-1c es el blanco principal para el control por los PUFAs sobre las enzimas claves del tejido hepático, solo la supresión de SREBP-1c no puede explicar la inhibición del gen de la enzima glucolítica piruvato quinasa hepática (L-PK) por los PUFAs. Esto significa, que la expresión de L-PK no está sujeta al control directo del SREBP-1c (Stoekman y Towle, 2002), y que además su promotor no posee sitio de regulación para este factor de transcripción (SER) (Moriizumi y col., 1998). Como mencionáramos anteriormente, en el “metabolismo normal del hígado”, ChREBP cumple un rol fundamental en la regulación de los genes glucolíticos por los PUFAs. Los PUFAs inhiben la actividad de ChREBP, alterando la estabilidad del ARNm y la translocación de su forma madura hacia el núcleo, tanto en hepatocitos aislados como en el hígado “in vivo” (Dentin y col., 2005).



En lo concerniente al efecto de la administración de aceite de pescado sobre el control glucémico, existen resultados discrepantes. A nivel experimental, Podolin y col. (1998) encontraron que la administración de sacarosa conteniendo aceite de “menhaden” (6% calorías) a ratas insulino resistentes durante 5 semanas, no mejoró la acción de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa. Otros estudios, a nivel humano, con pacientes con diabetes tipo 2 mostraron que el aceite de pescado puede llegar a empeorar el control de la glucemia (Popp-Snijders y col., 1987) (Rivellese y col., 1996). Otros investigadores no encontraron cambios ni mejoras en la sensibilidad insulínica de pacientes con diabetes tipo 2. Mc Mamus y col. (1996) observaron, en un grupo de personas con un control óptimo de su diabetes tipo 2, que 3 meses con aceite de pescado logró disminuir los niveles de Tg, pero no se modificaron los valores del control glucémico y colesterol, ni la secreción de insulina; mientras que se observó una tendencia a una disminución en la sensibilidad insulínica.

La mayoría de los estudios en modelos experimentales, se focalizan en la administración de aceite de pescado con el objeto de analizar el posible efecto preventivo del desarrollo de la dislipidemia y la RI. Pero son pocos los que han examinado en estos modelos, la posibilidad de mejorar y/o revertir ambas anomalías metabólicas una vez que las mismas están bien establecidas (Lombardo y col., 1996) (Lombardo y Chicco, 2006). En este contexto y por todo lo anteriormente expuesto, el modelo experimental “no genético” de dislipidemia y resistencia insulínica inducido por una ingesta crónica de una DRS y sedentarismo en sus etapas más tardías (8 meses de ingesta), resulta sumamente apropiado para esclarecer estos mecanismos así como para proyectar posibilidades terapéuticas a futuro.

## **OBJETIVOS**



**OBJETIVOS GENERALES** del presente trabajo de tesis fueron:

**a)** estudiar a nivel hepático en ratas alimentadas crónicamente (8 meses) con una DRS, algunos mecanismos bioquímicos y moleculares que conducen a la dislipidemia, anormal homeostasis de la glucosa y resistencia insulínica.

**b)** evaluar en el hígado de estos animales, los posibles cambios que puedan inducir los n-3 PUFAs de origen marino en los mecanismos involucrados en la dislipidemia y resistencia insulínica y que logren conducir a un mejoramiento y/o reversión de estas anormalidades.

Para alcanzar estos logros, se analizaron los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

**1) Metabolismo de lípidos:** Estudio de algunos mecanismos que analizan el destino preferencial (reserva, secretorio vs oxidación) de la mayor disponibilidad de AGNE plasmáticos y su relación con la RI. Con este fin se determinaron:

**a)** enzimas implicadas en la oxidación mitocondrial y peroxisomal de AG: oxidasa de ácidos grasos (FAO) y carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT 1);

**b)** enzimas claves de la síntesis hepática “de novo” de AG: sintasa de ácidos grasos (FAS), enzima málica (EM), glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa (G-6-PDH);

**c)** expresión de la masa proteica de los receptores nucleares PPAR- $\alpha$  y LRX- $\alpha$ ;

**d)** expresión génica y actividades de las enzimas desaturasas: SCD-1 (clave en la síntesis de AG monoenoicos),  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas (involucradas en la síntesis de AG polinosaturados);

**e)** velocidad de secreción de VLDL-Tg y remoción plasmática de Tg;

**f)** análisis de la composición lipídica de hígado total, fracción microsomal y especies moleculares.

**2) Metabolismo de la glucosa:** Determinación de actividades enzimáticas y metabolitos intermediarios de la vía oxidativa y no oxidativa de la glucosa a nivel hepático:



**a)** actividades de las enzimas: complejo piruvato dehidrogenasa (PDHc); glucoquinasa (GK), hexoquinasa (HK), glucosa-6-fosfato-fosfatasa (G-6-P-Pasa), glucógeno sintasa (GS), piruvato quinasa (PK), glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa (G-6-PDH), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK);

**b)** determinación de los niveles hepáticos de: glucógeno, glucosa-6-fosfato (G-6-P), fructosa-1-fosfato (F-1-P) y fructosa-2,6-bifosfato (F-2,6-P<sub>2</sub>);

**c)** determinación en condiciones fisiológicas (sin tratamiento previo con insulina) de algunas vías de señalización de la insulina: Expresión de la masa proteica de IRS-1 y subunidad  $\alpha$ p85 de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K).

**3)** Efectos de la sustitución de la fuente grasa dietaria (aceite de maíz (AM): rico en n-6, por aceite de hígado de bacalao (AHB): rico en n-3) a los fines de analizar los mecanismos involucrados en las posibles acciones beneficiosas de los n-3 PUFAs sobre el metabolismo de los lípidos y carbohidratos (glucosa) a nivel hepático. Para este fin se analizarán los parámetros a nivel bioquímico y molecular anteriormente mencionados.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DIETAS.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar C.F. provenientes de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA - Buenos Aires, Argentina), con un peso inicial de aproximadamente 180-200 g (adultos jóvenes). Desde su llegada al bioterio, los animales tuvieron libre acceso al agua y a una dieta estándar comercial de laboratorio (Ralston, Purina, St. Louis, MO, USA) y fueron mantenidos en condiciones de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y humedad controladas, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (7-19 hs). Transcurrida una semana desde su arribo al laboratorio (período de aclimatación), los animales fueron divididos al azar en dos grupos: a) **Control** y b) **Experimental**.

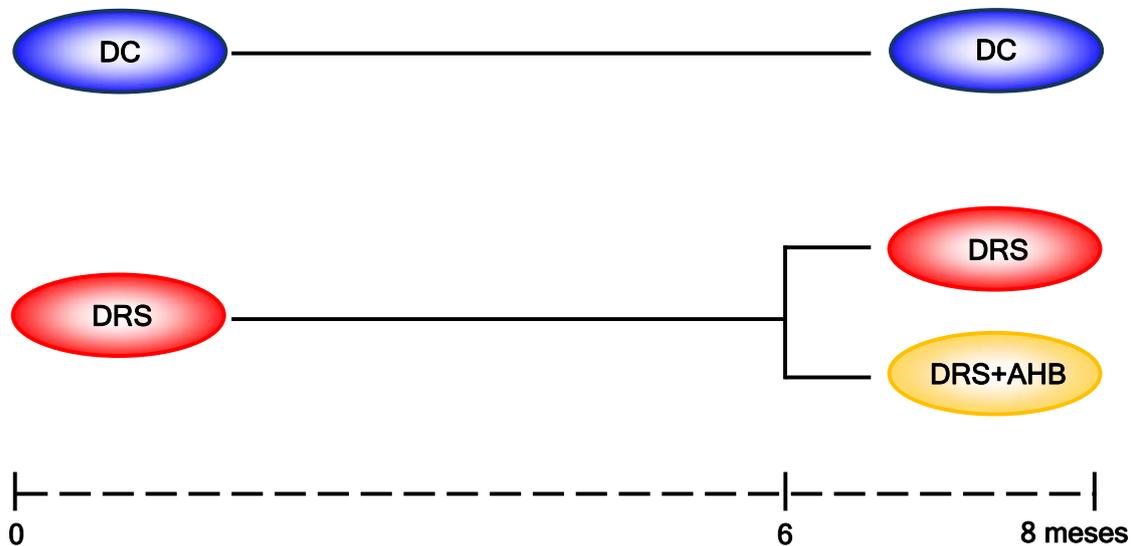
El grupo control recibió una dieta semisintética cuya fuente de hidratos de carbono fue almidón (62,5% p/p) (DC). El grupo experimental fue alimentado con la misma dieta semisintética con una única modificación en la fuente de hidratos de carbono, la sacarosa reemplazó al almidón (62,5% p/p) (DRS). En ambas dietas la fuente de grasa fue el aceite de maíz 8% p/p (AM).

Luego de 6 meses de ingesta, los animales del grupo experimental DRS se dividieron al azar en dos subgrupos: un subgrupo continuó con sacarosa 62,5% p/p y 8% AM hasta cumplir los 8 meses de ingesta, mientras que en el otro subgrupo se sustituyó el 8% AM por 7% de aceite de hígado de bacalao (AHB) más 1% AM hasta el octavo mes. Los animales del lote control continuaron con la DC hasta alcanzar el octavo mes, de acuerdo a lo descrito en el esquema experimental adjunto (**Figura 5**).

Las DC y DRS fueron balanceadas en colesterol, vitamina A y D presentes en el AHB de la dieta DRS+AHB durante los últimos 2 meses de experiencia.



Figura 5. Esquema experimental.



Ambas dietas fueron preparadas semanalmente siguiendo las recomendaciones de la dieta AIN-93M del Instituto Americano de Nutrición (Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writting Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet) y se conservaron a 4°C hasta el momento del consumo.

En la **Tabla 1** se describe la composición (% en peso y % en energía) de las dietas administradas. Las dietas son isocalóricas, proveen aproximadamente 16,24 kJ/g de comida y fueron administradas “ad libitum” durante todo el período experimental. El AHB fue dividido en alícuotas bajo atmósfera de nitrógeno. Las alícuotas fueron guardadas a -20°C e incorporadas diariamente a la dieta de acuerdo al tamaño del lote de animales en experimentación.

Más detalles sobre la preparación, contenido y manejo de las dietas se han descripto previamente por nuestro grupo (Pighin y col., 2003).

**Tabla 1.** Composición de las dietas experimentales<sup>1</sup>.

DIETA	g/100 g		
	DC	DRS	DRS + AHB
Caseína libre de vitaminas	17,0	17,0	17,0
Almidón de maíz	62,5	----	----
Sacarosa	----	62,5	62,5
Aceite de maíz	8,0	8,0	1,0
Aceite hígado de bacalao	----	----	7,0
Celulosa	7,5	7,5	7,5
Mezcla de sales <sup>2</sup>	3,5	3,5	3,5
Mezcla de vitaminas <sup>3</sup>	1,0	1,0	1,0
Cloruro de colina	0,2	0,2	0,2
Metionina	0,3	0,3	0,3

<sup>1</sup>Las dietas están basadas en las recomendaciones realizadas por el Instituto Nacional de la Nutrición, USA (dieta AIN-93M).

<sup>2</sup>Mezcla de sales basadas en la mezcla AIN-93M-MX (en g/Kg de dieta). Carbonato de calcio, 357,0; fosfato monobásico de potasio, 250,0; cloruro de sodio, 74,0; sulfato de potasio, 46,6; citrato de potasio monohidratado, 28,0; óxido de magnesio, 24,0; citrato férrico, 6,06; carbonato de zinc, 1,65; carbonato de manganeso, 0,63; carbonato cúprico, 0,30; yodato de potasio, 0,01; selenato de sodio, 0,01025; molibdato de amonio, 0,00795; cromato de potasio, 0,275.

<sup>3</sup>Mezcla de vitaminas basadas en la mezcla de AIN-93M-VX (en g/Kg de dieta). Niacina, 3,000; pantotenato de calcio, 1,600; piridoxina HCL, 0,700; tiamina HCL, 0,600; riboflavina, 0,600; ácido fólico, 0,200; D-biotina, 0,020; vitamina B12, 2,500; vitamina E (500 UI/g), 15,00; vitamina A (500.000 UI/g), 0,800; vitamina D3 (400.000 UI/g), 0,250; vitamina K, 0,075.



La composición centesimal de los ácidos grasos de los aceites de maíz e hígado de bacalao y la respectiva mezcla utilizada fueron analizados por cromatografía gaseosa con columna D.E.G.S. (Dietilen glicol succinato) 15% sobre Chromosorbw AW 80/100 (detector de ionización de llama -Hewlett Packard HP 5890 A). La misma puede observarse en la **Tabla 2**. Las muestras fueron previamente derivatizadas (transesterificadas a esteres metílicos mediante calentamiento a reflujo durante 8 horas en una solución de 5% de HCl (g) en metanol anhidro). Los ácidos grasos fueron identificados por el tiempo de retención en comparación con estándares conocidos. Estas determinaciones fueron realizadas en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral.

En la **Tabla 3** se expresa la composición de los ácidos grasos (% p/p) de las diferentes dietas que recibieron los animales durante todo el período experimental.

El peso de cada animal fue registrado dos veces por semana durante el transcurso de la experiencia. En un experimento en paralelo, utilizando un número adecuado de animales en cada lote, se determinó dos veces por semana la ingesta energética y la ganancia de peso individual.

Las dietas fueron administradas "ad libitum". En el día de los experimentos la comida fue retirada a las 7 horas, -salvo para las determinaciones realizadas en ayuno que se indicarán en su oportunidad- y los experimentos fueron realizados entre las 7 y 9 horas.



**Tabla 2.** Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de las diferentes fuentes de grasa<sup>a</sup>.

ACIDOS GRASOS <sup>b</sup>	AM <sup>c</sup>	AM + AHB <sup>d</sup>
14:0	Trazas	4,1
16:0	10,4	12,8
16:1 n-7	-	9,5
18:0	2,6	2,8
18:1 n-9	32,1	26,0
18:2 n-6	51,5	9,0
18:3 n-3	0,4	-
20:0	0,4	0,9
20:1 n-9	1,6	12,0
20:4 n-3	-	3,1
20:5 n-3	-	9,0
22:5 n-3	-	0,5
22:6 n-3	-	8,1
Total		
Saturados	13,4	20,6
Monoinsaturados	33,7	47,5
Polinosaturados n-6	51,5	9,0
Polinosaturados n-3	0,4	20,7
Relación Polinosat./Saturados	3,87	1,44
Relación n-3/n-6	0,008	2,30

<sup>a</sup> Composición de ácidos grasos del aceite de hígado de bacalao (% del total de ácidos grasos): 14:0 4,7; 16:0 12,8; 16:1 n-7 10,8; 18:0 3,0; 18:1 n-9 25,0; 18:2 n-6 2,6; 18:3 n-3 trazas; 20:0 0,9; 20:1 n-9 13,7; 20:4 n-3 3,5; 20:5 n-3 10,3; 22:5 n-3 0,6; 22:6 n-3 9,3. Relación Polinosaturados/Saturados: 1,23. Relación n-3/n-6: 9,11.

<sup>b</sup> Otros ácidos grasos menores se han excluido.

<sup>c</sup> Aceite de maíz (AM) Mazola (Best Foods, Canada, Starch, Montreal, Quebec, Canada).

<sup>d</sup> Incluye 1% p/p AM y 7% p/p AHB (MP Biomedicals, Inc. Ohio, USA).



**Tabla 3.** Composición de ácidos grasos (% p/p) de las diferentes dietas administradas a los animales durante todo período experimental.

ÁCIDOS GRASOS	DC y DRS	DRS+AHB
14:0	Trazas	4,1
16:0	10,4	12,8
16:1 n-7	-	9,5
18:0	2,2	2,8
18:1 n-9	32,3	26,0
18:2 n-6	51,5	9,0
18:3 n-3	0,4	-
20:0	0,4	-
20:1 n-9	1,6	12,0
20:4 n-3	-	3,1
20:5 n-3	-	9,0
22:5 n-3	-	0,5
22:6 n-3	-	8,1



## 2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE Y TEJIDOS.

Finalizado el período experimental, los animales fueron pesados y anestesiados en forma intraperitoneal con pentobarbital sódico (60 mg/Kg de peso corporal) y las experiencias se llevaron a cabo entre las 7 y 9 hs.

Las muestras de sangre fueron extraídas de la vena cava superior y centrifugadas a inmediatamente a 4°C. El suero obtenido se procesó en el momento o se conservó a -20°C hasta su procesamiento dentro de la semana de su extracción. En las mismas se cuantificaron los niveles de glucosa, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados, colesterol total e insulina.

Los tejidos hepáticos fueron obtenidos inmediatamente después de la extracción de sangre y de acuerdo a la técnica a realizarse, se utilizaron de inmediato (aislamiento de peroxisomas, etc.) o fueron congelados a la temperatura de nieve carbónica utilizando una pinza de Wollemberger (Wollemberger y col., 1960) previamente enfriada a dicha temperatura. Así congelados fueron pulverizados en un mortero con nieve carbónica y transferidos a tubos crioscópicos donde se conservaron a la temperatura de N<sub>2</sub> líquido hasta su procesamiento.

## 3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES - Métodos Analíticos.

### 3.1. Determinaciones séricas.

#### a. Glucosa (Glu)

Fue dosada por el método espectrofotométrico basado en el sistema enzimático glucosa oxidasa-peroxidasa de acuerdo a Bergmeyer (1974). Los resultados se expresaron como mM.

#### b. Triglicéridos (Tg)

Cuantificados por método espectrofotométrico de acuerdo a la técnica descrita por Laurell (1966). Brevemente, se extraen los lípidos utilizando como solvente no polar una mezcla de éter isopropílico/etanol (95:5 v/v) al tiempo que se extraen los fosfolípidos con ácido silícico. Los Tg contenidos en el sobrenadante se someten a hidrólisis alcalina con una mezcla de KOH/etanol (0,5/9,5 v/v). El glicerol liberado se recoge por adición de



una solución acuosa -  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,6 N - eliminándose los ácidos grasos liberados por aspiración de la capa orgánica. Finalmente el glicerol liberado se oxida a formaldehído al reaccionar con ácido peryódico. El exceso de este último se elimina con arsenito de sodio. El formaldehído reacciona con el ácido cromotrópico en medio sulfúrico y en caliente para dar un cromóforo violeta cuya intensidad se mide a 570 nm. Se utilizó como estándar trioleína (SIGMA - 99% pureza). Los resultados se expresaron como mM.

### c. Ácidos grasos no esterificados (AGNE)

Se cuantificaron a través del método espectrofotométrico que emplea acilCoA-sintasa en presencia de ATP, catión Mg y coenzima A (CoA) para transformarlos, en una primera etapa, en acilCoA. En una segunda etapa, éste es oxidado por la acilCoA-oxidasa con producción de peróxido de hidrógeno. El mismo en presencia de peroxidasa permite la formación de un producto de condensación oxidativa con un máximo de absorción a 550 nm cuya intensidad de color resulta proporcional a la cantidad de ácidos grasos presentes en la muestra. Se utilizó para esta determinación el kit enzimático comercial WACO NEFA-C (Wako Chemicals USA Inc., Richmond, Virginia, USA). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{M}$ .

### d. Colesterol total ( $\text{C}_T$ )

El  $\text{C}_T$  (suma del colesterol libre y esterificado) presente en el suero de ratas, se cuantificó espectrofotométricamente utilizando el kit enzimático comercial BioSystems (BioSystems S.A., Costa Brava 30, Barcelona, España). En una primera etapa el colesterol esterificado en presencia de la enzima colesterol-estearasa es hidrolizado a colesterol libre más ácido graso, luego en una segunda reacción el colesterol libre es oxidado en presencia de oxígeno y la enzima colesterol-oxidasa para formar colesteno y peróxido de hidrógeno, este último mediante la acción de la peroxidasa y en un medio con 4-aminoantipirina y fenol forma una quinoneimina coloreada. Las muestras se leen a 500 nm y la intensidad de color resulta proporcional al  $\text{C}_T$  presente en las mismas. Los resultados se expresaron en mg/dl.



### **e. Insulina (In)**

La insulina inmunorreactiva (IRI) fue dosada por el método propuesto por Herbert y col. (1965) utilizando como estándar insulina de rata (Novo Denmark). La sensibilidad fue de 0,5  $\mu\text{U/ml}$ , con un coeficiente de variación (CV) intra-ensayo de 8,7%, 6,2% y 5,1% para los rangos de determinación de 1-5, 5-10 y 10-50  $\mu\text{U}$  de insulina/ml respectivamente y coeficientes de variación inter-ensayo de 6,6%, 5,0% y 5,2% para dichos rangos. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{U/ml}$ .

## **3.2. Determinaciones en tejido hepático.**

### **3.2.1. Determinación de metabolitos.**

#### **a. Triglicéridos (Tg)**

Alícuotas de tejido hepático diluidas convenientemente (1/10) con solución fisiológica, fueron homogeneizadas a alta velocidad utilizando un homogeneizador con vástago de teflón previamente enfriado y mantenido entre 0 y 4°C. Volúmenes adecuados de dichos homogeneizados (0,1 ml) fueron utilizados para la determinación del contenido de Tg de acuerdo a la técnica de Laurell (1966) anteriormente descrita para la determinación de Tg en suero. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol/g}$  de tejido húmedo ( $\mu\text{mol/g TH}$ ).

#### **b. Ácidos grasos libres hepáticos (AGL)**

Porciones de tejido hepático pulverizados y diluidas (1/5) con buffer PBS pH: 7,5, que consiste en:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (anhidro) 800 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM y NaCl 100 mM, fueron homogeneizadas a alta velocidad con un homogeneizador con vástago de teflón según lo describen Rodgers y col. (2007). Volúmenes adecuados de los respectivos homogeneizados (0,2 ml) fueron expuestos a una mezcla extractante de cloroformo/metanol (2:1) para extraer los lípidos totales, filtrados y lavados según Folch y col. (1957). Luego el extracto se resuspendió en una mezcla de butanol 60%, Triton X-100/metanol (2:1) 40%. Finalmente el contenido de ácidos grasos se determinó utilizando el kit comercial WAKO NEFA-C (Wako Chemicals USA Inc., Richmond, Virginia, USA). Los resultados se expresaron como mg/100g tejido húmedo.

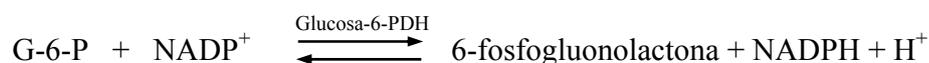


### c. Glucógeno

Se cuantificó el contenido de glucógeno en homogeneizados de tejido hepático utilizando el método enzimático descrito por Huijing y col. (1970) y previamente utilizado por nuestro grupo (Gutman y col., 1987). Brevemente, el glucógeno se hidroliza por la acción de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y aminoglucosidasa. La glucosa liberada se cuantifica de acuerdo al método de glucosa oxidasa/peroxidasa. Los resultados se expresaron en términos de glucosa liberada a partir del glucógeno como  $\mu\text{mol}$  glucógeno/g de tejido húmedo.

### d. Glucosa-6-fosfato (G-6-P)

Los niveles de G-6-P se determinaron espectrofotométricamente mediante el método propuesto por Lang y col. (Bergmeyer, 1974) en donde:



Aproximadamente 500 mg de tejido hepático pulverizado fueron homogeneizados en 2,5 ml de ácido perclórico 6 N y centrifugados a 4°C durante 10 minutos a 6500 rpm. Se separó el primer sobrenadante y al precipitado se le agregó (0,5 x g tejido) ml de H<sub>2</sub>O destilada y (0,5 x g tejido) ml de HClO<sub>4</sub>, se homogeneizó y se centrifugó (4°C) a 6500 rpm 10 minutos. El sobrenadante de la segunda centrifugación fue adicionado al de la primera y se le agregó K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5M hasta pH: 3,5. Se dejó reposar 15 minutos y se centrifugó 10 minutos a 6500 rpm. El sobrenadante se utilizó para la determinación de G-6-P. El medio de reacción (1 ml volumen final) consistió en: trietanolamina 0,2 M (pH: 7,6), cantidades adecuadas del extracto, NADP<sup>+</sup> 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y 170 U/L de la enzima glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-PDH - 214 U/mg proteína). Las lecturas se realizaron a 340 nm. La reacción se produjo estequiométricamente bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol}$  G-6-P/g tejido húmedo y fueron calculados según la siguiente ecuación:

$$\frac{\Delta \text{DO}}{\varepsilon} \times \frac{x}{d} \times \frac{V}{v} \times f = \mu\text{moles/g tejido húmedo}$$



Donde:  $\Delta DO$  = variación de la densidad óptica

$\varepsilon$  = coeficiente de extinción ( $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ ) correspondiente a la longitud de onda ( $\lambda$ ) utilizada (para  $\lambda = 340 \text{ nm}$ ,  $\varepsilon = 6,22$ )

$d$  = paso de luz cubeta (cm)

$V$  = volumen de ensayo (ml)

$v$  = volumen de muestra usada en el ensayo (ml)

$f$  = factor de dilución calculado de acuerdo a Lowenstein (1969):

$$f = \frac{[\text{g tejido} + (\text{ml HClO}_4 \times \text{densidad HClO}_4)] \times [\text{ml finales extracto} + \text{ml K}_2\text{CO}_3]}{\text{g tejido} \times \text{ml finales extracto}}$$

#### e. Fructosa-1-fosfato (F-1-P)

La F-1-P se cuantificó espectrofotométricamente a 340 nm, en un medio donde la disminución del NADH resultó proporcional a la cantidad de F-1-P (Bergmeyer, 1974).



Aproximadamente 1 g de tejido hepático pulverizado se homogeneizó con 4 ml de  $\text{HClO}_4$  6% p/v, se dejó reposar 15 minutos en baño de hielo y se centrifugó 15 minutos a 3000 rpm y a 4°C. Se separó el sobrenadante y se agregó KOH 20% p/v hasta alcanzar pH: 7,0. Nuevamente se dejó reposar 15 minutos en hielo y luego se removió el precipitado por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos. Luego de la desproteinización se separó el sobrenadante y se procedió a la determinación de F-1-P. Para ello, se empleó un medio de reacción (temperatura ambiente) conteniendo: buffer Tris 50 mM (pH: 7,4), NADH 0,07 mM, mezcla de enzimas: lactato deshidrogenasa (LDH) aprox. 5 U/ml, aldolasa muscular (ALD) 0,14 U/ml, glicerol-3-P deshidrogenasa (GDH) 0,1 U/ml y triosafosfato isomerasa (TPI) 1,4 U/ml, cantidades adecuadas del extracto y  $\text{H}_2\text{O}$



destilada hasta volumen final de 1ml. Luego de obtener una lectura constante (1-3 minutos aproximadamente) y registrarse la misma, se agregó 0,20 ml de aldolasa hepática 2,5 U/ml. Las lecturas se registraron a intervalos de 1 minuto durante 5 a 10 min. La reacción se produjo estequiométricamente bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol F-1-P/g}$  tejido húmedo y fueron calculados de acuerdo a la ecuación descrita para la determinación de G-6-P. El factor de dilución (f) fue calculado según Lowenstein (1969):

$$f = \frac{[\text{g tejido} + (\text{ml HClO}_4 \times \text{densidad HClO}_4)] \times [\text{ml finales extracto} + \text{ml KOH}]}{\text{g tejido} \times \text{ml finales extracto}}$$

#### f. Fructosa-2,6-bifosfato (F-2,6-P<sub>2</sub>)

La F-2,6-P<sub>2</sub> se determinó empleando el método descrito por Van Schaftingen y col. (1982). Se midió espectrofotométricamente a 340 nm en el sobrenadante obtenido a partir de un homogeneizado de hígado. Aproximadamente 1 g de hígado pulverizado más adicionado de 4 ml de NaOH 0,05 M se homogeneizó y calentó 10 minutos a 80°C. Posteriormente se enfrió y centrifugó 30 minutos a 14000 rpm. El volumen de sobrenadante fue neutralizado con HEPES 20 mM en ácido acético y nuevamente centrifugado durante 30 minutos a 14000 rpm. Se ajustó el sobrenadante a 0,05 M de Tris-HCl agregando un volumen de Tris-HCl 3,9 M (pH: 8,0). Se empleó el volumen final de sobrenadante como extracto para la determinación de F-2,6-P<sub>2</sub> a 30°C. El medio de reacción contenía para un volumen final de 3 ml: buffer Tris 53,7 mM + MgCl<sub>2</sub> 5,4 mM (pH: 8,0),  $\beta$ -NADH 0,14 mM, aldolasa muscular 0,17 U/ml, GDH-TPI 0,17 U/ml, D-fructosa-6-P (sal de potasio) 2,5 mM, D-glucosa-6-P (sal mono-sódica) 17,5 mM, cantidades adecuadas del extracto, PPI-PFK 4,2 mU/ml y pirofosfato 2,5 mM (pH: 8,0). A partir de una curva con concentraciones crecientes conocidas de una solución estándar de F-2,6-P<sub>2</sub>, se obtuvieron los niveles de F-2,6-P<sub>2</sub> presentes en la muestra. Los resultados se expresaron en nmol F-2,6-P<sub>2</sub>/g tejido húmedo, previa corrección con su correspondiente factor de dilución según Lowenstein (1969):



$$f = \frac{[g \text{ tejido} + (ml \text{ NaOH} \times \text{densidad NaOH}) \times [ml \text{ finales extracto} + ml \text{ HEPES}]]}{g \text{ tejido} \times ml \text{ finales extracto}}$$

### 3.2.2. Análisis lipídico.

Los lípidos fueron extraídos del homogeneizado total de hígado y de microsomas hepáticos de acuerdo al procedimiento indicado por Folch y col. (1957). Las muestras se esterificaron con F<sub>3</sub>B a 64°C durante 3 horas y la composición de ácidos grasos de los lípidos totales se determinó por medio de cromatografía gas-líquido a partir de sus ésteres de metilo como fuera descrito previamente por Montanaro y col. (2007).

La fosfatidilcolina microsomal se separó del resto de los lípidos por medio de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) de acuerdo Brenner y col. (2000). La separación de las especies moleculares de fosfatidilcolina se realizó empleando el método de Browsers y col. (1998).

### 3.2.3. Determinación de actividades enzimáticas.

#### 3.2.3.1. Enzimas de oxidación de ácidos grasos.

##### a. Carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT 1)

La actividad de la enzima CPT 1 se determinó espectrofotométricamente mediante la liberación de CoA-SH del palmitoil-CoA en homogeneizados de tejido hepático en presencia y ausencia de L-carnitina (Karlic y col., 2002). Brevemente, 1 gramo de tejido hepático se homogeneizó con un buffer (sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, etanol 0,1%, antipain 1 mg/L, aprotinin 2 mg/L, leupeptin 1 mg/L, pepstatin 0,7 mg/L, PMSF 0,2 mM) en relación 1:5 (p/v). Luego de centrifugaciones a 300 xg para la separación de detritos celulares y a 12000 xg para el aislamiento mitocondrial, se separó el sobrenadante y se procedió a la determinación de la actividad de CPT 1. Se incubaron dos fracciones conteniendo en un volumen final de 1 ml: 800 µl de buffer Tris-HCl-DTNB (Tris 116 mM, EDTA 2,5 mM, DTNB 0,11 mM y 0,2% Triton X-100 - pH: 8,0), 75 µl de buffer homogeneización (detallado anteriormente) y 100 µl de palmitoil-CoA 0,5 mM, con 5 µl de L-carnitina 1,1 mM y sin L-carnitina, durante 5 minutos a 30°C y luego se agregó la fuente



de enzima registrándose las densidades ópticas espectrofotométricamente a 412 nm. Se calculó la actividad enzimática con y sin el agregado de L-carnitina. La diferencia entre las mismas corresponde a la actividad enzimática de CPT 1 y fue expresada como mU/mg proteína. El contenido de proteína en el extracto se determinó de acuerdo al procedimiento descripto por Lowry y col. (1951).

#### **b. Oxidasa de Ácidos Grasos (FAO)**

La actividad enzimática de la oxidasa de ácidos grasos fue cuantificada utilizando el procedimiento propuesto por Vamecq (1990). Brevemente, se aisló una fracción enriquecida con peroxisomas según Goglia y col. (1989), homogeneizando (homogeneizador "Potter Elvehjem") 0,5 gramos de tejido hepático con cinco volúmenes de un buffer frío que contenía: sacarosa 0,3 mM, Tris-HCl 20 mM (pH: 7,4) y EDTA 0,5 mM. Luego de centrifugaciones a 3000 xg para la separación de detritos celulares y posteriormente a 27000 xg para el aislamiento peroxisomal, se resuspendió la fracción en el buffer anterior y se congeló inmediatamente hasta la determinación de la actividad. La actividad de FAO se determinó fluorométricamente mediante la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de una reacción peroxidativa acoplada, empleando homovanilato en presencia de horseradish peroxidase. La mezcla de reacción contenía: buffer glicilglicina 80 mM (pH: 8,3), homovanilato 5 mM, Brij 58 0,1 g/L, 0,1 mg de horseradish peroxidase (tipo II), FAD 0,02 mM y palmitoil-CoA 0,1 mM. La reacción comenzó con el agregado de palmitoil-CoA y se registraron las lecturas comenzando 4 minutos luego de iniciada la misma. A intervalos de 2 minutos, una alícuota fue removida y mezclada con 3 ml de buffer carbonato-bicarbonato 0,5 M (pH: 10,7). La fluorescencia producida se midió en un espectrofluorómetro a una longitud de onda de 325 nm (excitación) y 425 nm (emisión). Además se realizó la correspondiente curva de calibrado, con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> preparada de un solución al 30%. La actividad de la enzima se expresó como mU/mg proteína. La concentración de proteína se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar Lowry y col. (1951).



### **3.2.3.2. Enzimas lipogénicas.**

#### **a. Sintasa de Ácidos Grasos (FAS)**

La fracción citosólica de las muestras de homogeneizado hepático (con buffer conteniendo: sacarosa 0,25 M, DTT 1 mM y EDTA 1 mM -pH: 7,4) fue obtenida por centrifugación a 100.000 xg durante 1 hora a 4°C y se determinó inmediatamente la actividad de FAS como fue descrito anteriormente por Halestrap y Denton (1973). La actividad de FAS se cuantificó espectrofotométricamente a 340 nm a temperatura ambiente en un medio conteniendo: buffer fosfato de potasio 100 mM (pH: 6,5), NADPH 0,1 mM, acetil-CoA 25  $\mu$ M y cantidades adecuadas de muestra. La reacción se inició inmediatamente del agregado de malonil-CoA 60  $\mu$ M. Se registró la variación de densidad óptica debido a la oxidación de NADPH; una unidad de actividad enzimática representa 1  $\mu$ mol de NADPH oxidado por minuto a 37°C. La concentración de proteína se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951). Los resultados se expresaron como mU/mg proteína.

#### **b. Enzima Málica (EM)**

La actividad fue medida mediante el método propuesto por Ochoa con una pequeña modificación de acuerdo a Hsu y col. (1969). Se registró la variación de densidad óptica en un buffer de reacción conteniendo: trietanolamina 0,4 M,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0,12 M y  $NADP^+$  3,4 mM). Luego de 10 minutos (para estabilizar la lectura) se agregó L-malato 0,03 M y se leyó a intervalos de 15 segundos a 340 nm en espectrofotómetro. Una unidad de actividad enzimática representa 1  $\mu$ mol de  $NADP^+$  reducido por minuto a 340 nm y a 37°C. La concentración de proteína del extracto se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951). Los resultados fueron expresados como mU/mg proteína.

#### **c. Glucosa-6-fosfato-Dehidrogenasa (G-6-PDH)**

La actividad de la enzima G-6-PDH fue analizada como se describió anteriormente (Chicco y col., 1996). Aproximadamente 500 mg de hígado congelado se homogeneizó con 10 volúmenes de buffer fosfato-bicarbonato ( $KHCO_3$  70 mM,  $K_2HPO_4$  85 mM,  $KH_2PO_4$  9 mM, DTT 1 mM -pH: 8) utilizando homogeneizador "Potter-Elvehjem". Luego de centrifugar 40 minutos a 15000 rpm se utilizó el sobrenadante para la determinación de la actividad enzimática. Se registró la variación de densidad óptica a 340 nm en un medio



que contenía: buffer trietanolamina 0,04 M (pH: 7,5), NADP<sup>+</sup> 0,5 mM, cantidades adecuadas de muestra y G-6-P 0,67 mM en un volumen final de 3 ml. La velocidad de formación de NADPH, expresada en  $\mu\text{mol}/\text{minuto}$ , representa la actividad enzimática de G-6-PDH. La concentración de proteína del extracto se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951). Los resultados fueron expresados como mU/mg proteína.

### ***3.2.3.3. Enzimas de desaturación de ácidos grasos.***

#### **a. Enzimas Esteroil-CoA Desaturasa 1 (SCD-1), $\Delta 6$ -Desaturasa y $\Delta 5$ -Desaturasa**

Trozos de hígado fresco se homogeneizaron en una solución (1:3 p/v) compuesta por sacarosa 0,25 M, KCl 0,15 M, EDTA 9,1 mM, N-acetil-cisteína 1,14 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y buffer fosfato 62 mM (pH: 7,4). Las muestras se centrifugaron a 10000 xg durante 30 minutos. Los microsomas se aislaron por ultracentrifugación diferencial a 100000 xg (Beckman Ultracentrifuge). Las actividades de SCD-1,  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas se cuantificaron en los microsomas hepáticos aislados inmediatamente, a fin de evitar la desactivación enzimática por hidrólisis proteica.

Las actividades se determinaron empleando como sustratos 30  $\mu\text{M}$  de [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] ácido palmítico para la SCD-1, 33  $\mu\text{M}$  de [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] ácido linoleico para la  $\Delta 6$ -desaturasa y 40  $\mu\text{M}$  de [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] ácido eicosa-8,11,14-trienoico para la  $\Delta 5$ -desaturasa. 2,5 mg de proteína microsomal fueron incubados con los respectivos sustratos en un volumen final de 1,5 ml a 36°C durante 15 minutos. La mezcla de reacción consiste en sacarosa 0,25 M, KCl 0,15 M, N-acetil-cisteína 1,41 mM, NaF 40 mM, CoA (sal sódica) 60 mM, ATP 1,3 mM, NADH 0,87 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y buffer fosfato de potasio (pH: 7,4). La reacción de desaturación finalizó con la adición de KOH 10% (p/v) en etanol, seguida de una saponificación. Los ácidos grasos libres extraídos fueron disueltos en una mezcla de metanol/ $\text{H}_2\text{O}$ /ácido acético (85:15:0,2 v/v/v) y fraccionados mediante cromatografía líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC), con un tamaño de partícula Econosil C18-10 mm en una columna de fase reversa (250 mm x 4,6 mm) (Alltech Associates, Inc. Deerfield, IL) acoplada a una pre-columna (10,4 mm) revestida con una película C18. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol/ $\text{H}_2\text{O}$ /ácido acético (90:10:0,2 v/v/v). El eluyente de la columna fue monitoreado mediante un espectrofotómetro UV a 205 nm



para identificar los ácidos grasos en base a sus tiempos de retención. El efluente fue mezclado con un coctel de centelleo Ultima Flo-M (Packard Instruments. Downers Grove, IL) en una relación 1:3, y la radioactividad se midió pasando la mezcla a través de un detector on-line de radioactividad: Radiomatic Instruments FloOne-β (Tampa, FL). (Brenner y col., 2003). Los resultados se expresan como mU/mg proteína.

#### ***3.2.3.4. Enzimas implicadas en el metabolismo de hidratos de carbono.***

##### **a. Glucógeno Sintasa (GS)**

La glucógeno sintasa (GS) está presente en el tejido en dos formas interconvertibles: **a** (activa, desfosforilada) y **b** (inactiva, fosforilada). La forma **b** sólo muestra actividad en presencia de concentraciones saturantes de G-6-P, que actúa como efector alostérico positivo. La forma **a** es activa, independientemente de la presencia de G-6-P.

La actividad de la enzima GS presente en el homogeneizado del tejido hepático fue determinada in vitro de acuerdo al método de Golden y col. (1997) que mide la incorporación de UDP-<sup>14</sup>Cglucosa en glucógeno. El glucógeno así formado se separa por pasaje a través de una columna conteniendo una resina de intercambio aniónico que retiene los compuestos fosforilados y otros electrolitos. El efluente contiene el glucógeno.

Brevemente, el tejido hepático fue homogeneizado en un buffer Tris-HCl 50 mM (pH= 6,8) conteniendo NaF 100 mM, EDTA 10 mM, glucógeno 0,5% (p/v) y ditioneitol (DTT) 5 mM. Una alícuota de homogeneizado fue agregada a un medio de reacción conteniendo Tris 50 mM (pH=7,5), EDTA 10 mM, glucógeno 1% (p/v), UDP-glucosa 1,5 mM, UDP-<sup>14</sup>C glucosa (actividad específica: 267 μCi/mmol), y G-6-P 0.1 mM (baja concentración de G-6-P) o 10mM (elevada concentración de G-6-P) e incubada 7 minutos a 37°C. La reacción se detiene pasando cada una de las muestras en columnas conteniendo una resina de intercambio aniónico Dowex 1 x 8, 100-200 mesh para aislar el glucógeno marcado generado. Posteriormente las columnas fueron lavadas dos veces con agua bidestilada, recolectando el eluido en mini-viales de centelleo. A los mismos se les adicionó una mezcla de centelleo constituida por 1 volumen de tolueno, 1 volumen de Triton X-100, 60 mg de POPOP (1,4 bis [5-fenil-2-oxazolil]-benceno; 2,2'-p-fenileno-bis[5-feniloxazol]) y 5 g de PPO (2,5-difeniloxazol)/L. Finalmente, cada mini-vial fue cuantificado por centelleo líquido.



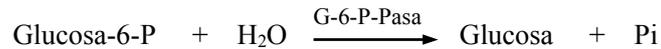
Los resultados se expresaron como % de la actividad fraccional (% GSa/a+b) que fue calculada como la relación entre la actividad GSa (medida a bajas concentraciones de G-6-P: 0,1 mM) y la actividad GSa+b (medida a altas concentraciones de G-6-P: 10 mM), expresándose dicha razón como porcentaje. Esta forma de expresión, propuesta por Guinovart y col. (1997), es muy sensible ya que refleja las variaciones en la capacidad de síntesis de glucógeno ofreciendo una aproximación al estado de activación de la GS en la célula.

### **b. Glucoquinasa (GK) y Hexoquinasa (HK)**

Las actividades de GK y HK fueron determinadas espectrofotométricamente según el método propuesto por Davidson y Arion (1987), con algunas modificaciones. El tejido hepático congelado y pulverizado (0,8 g) fue homogeneizado con un buffer conteniendo: HEPES 50 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y ditioneitol (DTT) 2,5 mM. Luego se centrifugó a 100000 xg durante 45 minutos a fin de separar la fracción microsomal (utilizada para cuantificar la actividad de la enzima Glucosa-6-fosfato-fosfatasa). La fracción post-microsomal (sobrenadante) fue empleada para analizar las actividades totales (GK + HK) y HK y por su diferencia la actividad de la GK. Se utilizó un medio (pH: 7,4; 37°C) que contenía: HEPES 50 mM, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, ATP 5 mM, DTT 2,5 mM, albúmina 10 mg/ml y glucosa 0,5 mM (actividad de HK) y 7, 10, 15, 18 y 50 mM de glucosa (actividad total: GK + HK), NAD<sup>+</sup> 0,5 mM y 4 unidades de G-6-PDH (*Leuconostoc mesenteroides*) y el equivalente a 1 mg de tejido hepático húmedo. La reacción fue iniciada por la adición de ATP 5 mM, registrándose el incremento de las densidades ópticas por la reducción del NAD<sup>+</sup> a 340 nm. La fosforilación de la glucosa se determinó por el cambio de absorbancia en presencia y ausencia de glucosa, bajo condiciones en la cual se registra un incremento lineal en función del tiempo (desde 20 a 40 minutos). La concentración de proteína del extracto se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951). Los resultados se expresaron como mU/mg proteína.

### **c. Glucosa-6-fosfato-fosfatasa (G-6-P-Pasa)**

La actividad de G-6-P-Pasa fue determinada espectrofotométricamente a partir de homogeneizado de tejido hepático congelado según Bergmeyer (1963) con algunas modificaciones. El principio de la determinación se basa en la hidrólisis de la G-6-P con liberación de fosfato inorgánico (Pi):



El precipitado obtenido según la descripción efectuada para la técnica de la enzima GK, fue resuspendido en el mínimo volumen de buffer citrato 100 mM (pH: 6,5). En la reacción enzimática: 0,1 ml de homogeneizado hepático fue adicionado a 0,1 ml de G-6-P 0,08 M incubando 15 minutos a 37°C. Paralelamente se incubaron 0,1 ml de homogeneizado hepático con 0,1 ml de buffer citrato y 0,1 ml de buffer citrato con 0,1 ml de G-6-P 0,08 M, utilizados como controles. Se adicionó 2 ml de ácido tricloroacético a cada tubo, se centrifugaron y se utilizaron los sobrenadantes para la determinación de Pi liberado.

La determinación del fosfato liberado se realizó según Fiske y Subbarow (1925). Brevemente, 1 ml de sobrenadante se adicionó a 5 ml de solución de molibdato de amonio y 1 ml del agente reductor (1-amino-2-naftol-4-ácido sulfónico 42 mM; 0,56 M  $\text{SO}_3^{2-}$ ). Luego de 15 minutos se determinó la DO a 660 nm. Se construyó una curva estándar utilizando diferentes concentraciones de Pi. La concentración de proteína del extracto se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951). Los resultados se expresaron en mU/mg proteína.

#### d. Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa (PEPCK)

La enzima PEPCK se extrajo a partir de homogeneizado de tejido hepático congelado según Blakely y col. (1981). Aproximadamente 1 g de tejido hepático se homogeneizaron con 10 volúmenes de buffer de homogeneización pH: 7,0, a 4°C conteniendo: Tris 0,01 M,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, EDTA 5 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM. Luego de la homogeneización a 4°C se centrifugó en ultracentrífuga a 30000 xg durante 30 minutos y se separó el sobrenadante para la determinación de la actividad enzimática. La actividad PEPCK se determinó espectrofotométricamente según la técnica descrita por Petrescu y col. (1978). El medio de reacción consistió en buffer Tris-HCl 50 mM (pH: 7,5) conteniendo  $\text{MnCl}_2$  1 mM,  $\text{NADH}_2$  0,1 mM, deoxiguanosina difosfato (dGDP) 0,2 mM, fosfoenolpiruvato (sal triciclohexilamonio) 0,5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  20 mM, 2 unidades de málico deshidrogenasa (previa diálisis overnight con agua destilada a 4°C a fin de remover el  $\text{NH}_4^+$ ) y 0,2-1,0 mg



del extracto enzimático fueron agregados a 1 ml del medio de reacción. La reacción se inició mediante la adición de 0,2 mM de dGDP, registrando la oxidación del  $\text{NADH}_2$  a 340 nm y a 25°C. Un blanco empleado como control, al cual no se le adicionó el  $\text{NAHCO}_3$ , fue sometido al mismo procedimiento anterior. La concentración de proteína del extracto se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951). Los resultados se expresaron en mU/mg proteína.

#### e. Complejo Piruvato Dehidrogenasa (PDHc)

La extracción del complejo PDH a partir de hígado congelado de ratas se realizó como fuera detallado anteriormente según Goodwin GW y col. (1988). Brevemente, 0,5 g de hígado congelado se homogeneizaron con 9 volúmenes de un buffer a 20°C (pH: 7,5) que contenía: HEPES 50 mM, KCl 20 mM, EDTA 3 mM, DTT 5 mM, dicloro-acético (DCA) 5 mM, TLCK 0,1 mM, inhibidor de tripsina 0,1 mg/ml, leupeptin 0,5  $\mu\text{M}$ , pepstatin A 0,5  $\mu\text{M}$ , aprotinin 1  $\mu\text{g/ml}$ , tiamina-pirofosfato (TPP) 0,5 mM, suero de rata 2 % (v/v) y Triton X-100 0,5 % (v/v). El homogeneizado fue congelado a la temperatura de nieve carbónica y descongelado cuatro veces seguidas y sonificado durante 30 segundos. El homogeneizado fue centrifugado a 12000 xg durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo previamente tarado y se procedió a precipitar el PDHc llevándolo a 9% (p/v) de polietilenglicol incubándolo durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 12000 xg durante 10 minutos y el precipitado fue resuspendido con buffer de homogeneización a una concentración final de 50-100 mg de tejido húmedo/ml para la posterior determinación de la actividad del complejo PDH a 340 nm.

Se procedió a determinar la actividad PDH en su forma activa (PDHa) y PDH total (PDHt) llevando a la máxima actividad mediante pre-incubación durante 60 minutos a 37°C con un volumen necesario de enzima fosfatasa (aislada según Brand H y col. (1974)) y  $\text{MgCl}_2$  100 mM. Para la determinación de ambas actividades, el buffer de reacción consistió en: buffer KPi 30 mM, TPP 0,4 mM, coenzima A (CoA) 0,4 mM, DTT 2 mM,  $\text{NAD}^+$  3mM, Triton X-100 0,1% (v/v), 10 U/ml de dihidrolipoamida reductasa ( $\text{E}_3$ ) y  $\text{MgCl}_2$  2 mM. El medio de reacción a 30°C para 1 ml de volumen final consistió en: 593  $\mu\text{l}$  del buffer de reacción, 200  $\mu\text{l}$  de piruvato 5 mM y cantidad adecuada del extracto enzimático. Los resultados se expresaron como porcentaje de la actividad del complejo PDH,  $[\text{PDHa} = (\text{actividad basal} / \text{actividad total}) \times 100]$ . La concentración de proteína del extracto se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951). La





Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR) empleando un equipo MX3000 (Stratagene, La Jolla, CA). 1 micro-gramo de ARN total de cada rata individual se utilizó para generar el ADNc mediante el kit comercial Affinity Script QPCR ADNc (Stratagene). Cantidades similares de ADNc fueron amplificadas con Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene). Los niveles del ARNm fueron normalizados con  $\beta$ -actina. Los primers utilizados en la RT-PCR fueron los siguientes: SCD-1, 5'-ACATTCAATCTCGGGAGAACA-3' (forward) y 5'-CCATGCACTCGATGAAGAAC-3' (reverse);  $\Delta 6$ , 5'-TGTCCACAAGTTTGTTCATTGG-3' (forward) y 5'-ACACGTGCAGGTCTTTATG-3' (reverse);  $\Delta 5$ , 5'-TGGAGAGCAACTGGTTTGTG-3' (forward) y 5'-GTTGAAGGCTGACTGGTGAA-3' (reverse);  $\beta$ -actina, 5'-TGTCAGCAATGCCTGGGTACA-3' (forward) y 5'-ACTATTGGCAACGACCGGTT-3' (reverse).

### 3.2.5. Análisis de masa proteica por la técnica Western Blot.

#### a. Receptor- $\alpha$ activador de la proliferación peroxisomal (PPAR- $\alpha$ )

100 mg de hígado pulverizado fue homogeneizado con un buffer (1/10) que contiene Tris-HCl 20 mM (pH: 7,5), NaCl 150 mM, Triton-X100 1%, aprotinin 1%, fenilmetilsulfonilfluoruro 1mM (PMSF), benzamidina 1 mM, dejándolo reposar durante 120 minutos a 4°C según Federici y col. (2001). El lisado de tejido se centrifugó a 10000 xg durante 2 horas a fin de remover el material insoluble.

El análisis por Western Blot se realizó según Nagai y col. (2002). Cada muestra (50  $\mu$ g proteína/línea) se desnaturalizó hirviendo durante 3 minutos en buffer de muestra Laemmli y se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) en un gel al 12%. Las proteínas se electro-transferieron (50 volts constantes) a una membrana de PVDF toda la noche empleando un buffer de transferencia (pH: 8,8) que contenía Tris 20 mM, glicina 150 mM, 0,1% de SDS y 20% de metanol. Las membranas fueron bloqueadas con Tris-buffer conteniendo 0,1% Tween 20 y 5% de leche descremada durante 8 horas a 4°C. Para el inmunobloting, las membranas se expusieron al anticuerpo primario específico policlonal de conejo: anti-PPAR- $\alpha$  (dilución: 1:400) (Santa Cruz



Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) a 4°C durante toda la noche. Luego se incubaron con el anticuerpo secundario (dilución: 1:2000) conjugado con horseradish-peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente y se procedió a la detección por quimioluminiscencia, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). Las intensidades de las manchas se cuantificaron utilizando el software para capturar imágenes del National Institute of Health (Bethesda, MD). Estudios preliminares demostraron una linealidad en el ensayo de Western Blot entre 25 y 100 µg de proteínas. El coeficiente de correlación entre la cantidad de proteína y la intensidad de señal observada en el inmunoblotting resultó lineal bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Se empleó extracto de riñón como control positivo de PPAR- $\alpha$ . Los valores de la masa proteica del PPAR- $\alpha$  fueron corregidos por los niveles de  $\beta$ -actina presentes en cada una de las muestras.

Las proteínas de los extractos se cuantificaron con el ensayo de Bio-Rad (BIO-RAD Laboratories, Inc., Alfred Nobel Dr., Hercules, CA).

#### **b. Receptor Hepático X- $\alpha$ (LXR- $\alpha$ )**

70 µg de proteínas de homogeneizado total de hígado fue analizado por SDS-PAGE y transferidos a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK). Las membranas fueron expuestas al anticuerpo primario específico para el LXR- $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) (dilución 1:200) y luego al anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado con horseradish-peroxidasa (dilución 1:5000) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) empleando buffer PBS-Tween que contenía 1% de leche descremada para el bloqueo y 5% de leche para la incubación con los respectivos anticuerpos. Finalmente la actividad peroxidasa se reveló utilizando un sustrato de Pierce ELC (Pierce, Rockford, IL) y se cuantificó por medio del software Kodak Digital Science (Kodak, Rochester, NY).

#### **c. Sustrato Receptor de Insulina 1 (IRS-1)**

La determinación de la masa proteica del sustrato receptor de insulina 1 (IRS-1) fue realizada según lo descrito por Bezerra y col. (2000). Brevemente, 100 µg de tejido hepático congelado fueron homogeneizados (homogeneizador con vástago de teflón -



máxima velocidad durante 20 segundos) a 4°C un buffer conteniendo: 10 ml/l Triton X-100, Tris 100 mM (pH: 7,4), pirofosfato de sodio 100 mM, fluoruro de sodio 100 mM, EDTA 10 mM y vanadato de sodio 10 mM, al cual se agregó 5 µl de coctel inhibidor de proteasas (SIGMA). Se centrifugó durante 20 minutos a 16000 xg (4°C) para remover el material insoluble y se aisló el sobrenadante para la determinación de la concentración de proteínas de los extractos mediante el ensayo de Bio-Rad BIO-RAD Laboratories, Inc., Alfred Nobel Dr., Hercules, CA).

Cada muestra (100 µg proteína) se desnaturalizó hirviendo durante 3 minutos en buffer de muestra Laemmli y se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 6%. Luego se electro-transfirieron (50 volts constantes) a una membrana de PVDF toda la noche empleando un buffer de transferencia (pH: 8,8) que contenía Tris 20 mM, glicina 150 mM, 0,1% de SDS y 20% de metanol. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con Tris-buffer conteniendo 0,1% Tween 20 y 5% de leche descremada durante 8 horas a 4°C. Las membranas fueron expuestas al anticuerpo primario específico policlonal de conejo: anti-IRS-1 (dilución: 1:800) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) a 4°C durante toda la noche. Luego se incubaron con el anticuerpo secundario (dilución: 1:2000) conjugado con horseradish-peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente y se procedió a la detección por quimioluminiscencia, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). Las intensidades de las manchas se cuantificaron utilizando el software para capturar imágenes del National Institute of Health (Bethesda, MD). Estudios preliminares demostraron una linealidad en el ensayo de Western Blot entre 50 y 200 µg de proteínas. El coeficiente de correlación entre la cantidad de proteína y la intensidad de señal observada en el inmunoblotting resultó lineal bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

#### **d. Subunidad $\alpha$ p85 de la fosfatidilinositol-3-quinasa ( $\alpha$ p85 PI3K)**

En la determinación de la subunidad  $\alpha$ p85 de la PI3K partimos del extracto realizado para la determinación del IRS-1. 100 µg de proteínas de cada extracto fue analizado por SDS-PAGE en gel al 8% y transferidos a una membrana de PVDF. Las membranas fueron expuestas al anticuerpo primario específico para la  $\alpha$ p85 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) (dilución 1:1000) y luego al anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado con horseradish-peroxidasa (dilución 1:1000) durante 2 horas a



temperatura ambiente, empleando buffer PBS-Tween que contenía 1% de leche descremada para el bloqueo. Luego se procedió a la detección por quimioluminiscencia, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). Las intensidades de las manchas se cuantificaron utilizando el software para capturar imágenes del National Institute of Health (Bethesda, MD). Estudios preliminares demostraron una linealidad en el ensayo de Western Blot entre 25 y 150  $\mu\text{g}$  de proteínas. El coeficiente de correlación entre la cantidad de proteína y la intensidad de señal observada en el inmunobloting resultó lineal bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Se empleó extracto músculo gastronemio como control positivo de  $\alpha\text{p85 PI3K}$ . Los valores de la masa proteica de la subunidad  $\alpha\text{p85 PI3K}$  fueron corregidos por los niveles de  $\beta\text{-actina}$  presentes en cada una de las muestras.

Las proteínas de los extractos se cuantificaron con el ensayo de Bio-Rad (BIO-RAD Laboratories, Inc., Alfred Nobel Dr., Hercules, CA).

### 3.3. Estudios que analizan los mecanismos de la hipertrigliceridemia.

#### 3.3.1. Velocidad de secreción de triglicéridos hepáticos (VSTG).

En todos los lotes dietarios se determinó la VSTG utilizando para tal fin la metodología propuesta por Otway y col. (1967). La misma se fundamenta en la inhibición de la remoción intravascular de las lipoproteínas de  $d < 1,006 \text{ g/ml}$  por la administración de un detergente no iónico: Triton WR 1339 (Lote # 88FA0359, Sigma Chemical Company, USA). Los animales ayunados durante 12-18 hs fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso corporal) administrándoseles, por vía endovenosa, una solución de Triton al 10% (v/v) en 0,9% NaCl (dosis: 600 mg/Kg peso). La velocidad de secreción de los triglicéridos se calculó considerando un incremento lineal de los triglicéridos plasmáticos en función del tiempo. Estudios preliminares en nuestro laboratorio demostraron que dicho incremento es lineal hasta las dos horas y media (Bernal, 1989). En muestras de sangre obtenidas al tiempo 0' (previa administración del Triton WR 1339) y a los 60 minutos y 120 minutos posteriores se analizó el contenido de triglicéridos por la técnica de Laurell y se calculó la VSTG según la siguiente fórmula:

$$\text{VSTG (nmol/min x 100 g rata)} = \frac{[\text{Tg}_{120}] - [\text{Tg}_0] \times \text{Vp} \times 100}{120 \times \text{P} \times 1000}$$



Donde:

VSTG: velocidad de secreción plasmática de triglicéridos

Tg<sub>120</sub>: concentración (nmol/l) de triglicéridos plasmáticos al tiempo 120 minutos

Tg<sub>0</sub>: concentración (nmol/l) de triglicéridos plasmáticos al tiempo 0

Vp: volumen plasmático (ml)

P: peso del animal en gramos

100: factor para corregir la expresión por 100 g de rata

1000: factor para corregir las unidades de volumen

El volumen plasmático (Vp) se determinó en una experiencia paralela mediante la técnica de dilución del Azul de Evans (Wang y col., 1949). Para este propósito a animales ayunados y anestesiados como se describió previamente, se les extrajo 0,4 ml de sangre de la vena yugular y por la misma vía se les inyectó 0,2 ml de una solución de colorante Azul de Evans 0,4%. A los 5 minutos de la inyección del colorante se extrajo aproximadamente 1 ml de sangre de la vena cava inferior. Las muestras de sangre fueron centrifugadas y el suero diluido 1/10 en ambos casos. La absorbancia de la muestra se leyó a 600 nm en espectrofotómetro. La absorbancia debida al colorante fue calculada por diferencia entre el valor obtenido para la muestra de plasma diluido extraído antes y después de 5 minutos de la administración del Azul de Evans. La curva de calibrado fue construida agregando cantidades aditivas del colorante a la muestra basal de plasma diluido. El volumen plasmático fue calculado según la siguiente fórmula:

$$Vp \text{ (ml)} = \frac{m}{C}$$

Donde: **m** es la masa en  $\mu\text{g}$  de Azul de Evans adicionada y **C** la concentración en  $\mu\text{g/ml}$  del colorante luego de 5 minutos de su administración.

El pool de triglicéridos plasmáticos fue determinado a partir de los niveles basales de triglicéridos según la siguiente expresión:



$$\text{Pool de Tg plasmáticos (nmol/100 g de rata)} = \frac{[Tg_0] \times Vp \times 100}{P}$$

Donde:

Tg<sub>0</sub>: concentración (nmol/l) de triglicéridos plasmáticos al tiempo 0

Vp: volumen plasmático (ml)

P: peso del animal en gramos

100: factor para corregir la expresión por 100 g de rata

### 3.3.2. Test de tolerancia grasa endovenoso: Determinación de la velocidad de remoción de triglicéridos plasmáticos.

El test de tolerancia grasa endovenoso que utiliza una emulsión grasa artificial es una herramienta adecuada para estudiar la dinámica de los triglicéridos tanto en estados metabólicos normales como alterados (Rösner y col., 1974). Se ha comprobado que el Intralipid, actúa como marcador útil para el estudio de la velocidad fraccional de remoción de los Tg circulantes. El mismo consiste en una emulsión grasa de aceite de soja compuesto por ácido oleico, ácido linolénico, ácidos grasos saturados y lecitina-20%, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, trazas de esfingomielina (1 a 2 g%), glicerol (1,25%) y trazas de colesterol. Al ponerse en contacto con la circulación esta partícula lipídica adquiere apo CII, CIII y apo A de lipoproteínas ( $\alpha$ -lipoproteínas -HDL-) del animal receptor, constituyendo de esta manera un sustrato adecuado para ser degradado en forma similar a las VLDL y Quilomicrones por las enzimas lipolíticas tisulares (especialmente del músculo esquelético).

El estudio se llevó a cabo en todos los lotes, con animales ayunados 16-18 hs a los cuales se inyectó por vía endovenosa 0,1 ml/100 g de peso corporal de Intralipid al 10% (Lote M.R.50818B, Kabivitrum, Inc., Alameda Ca, USA) como describimos en trabajos previos del grupo (Chicco y col., 2000). Se recolectaron muestras de sangre heparinizada (0,2-0,3 ml) inmediatamente antes y en forma seriada entre 2 y 30 minutos luego de la inyección y se mantuvieron a 0-4°C hasta finalizar el estudio. Posteriormente dichas muestras se centrifugaron a 600 rpm durante 10 minutos a esa temperatura. Se recolectó el plasma libre de glóbulos rojos y se repitió la centrifugación bajo las mismas condiciones para eliminar cualquier remanente de glóbulos rojos. Una alícuota del plasma (0,2 ml) se



diluyó a 10 ml con solución fisiológica y se midió la dispersión de la luz por nefelometría. Se realizó una curva de calibrado usando una dilución en solución salina 1/2000 del mismo batch de Intralipid como describiera Lewis y col. (1972). Todas las lecturas nefelométricas se ajustaron sustrayéndoles un blanco salino. El valor del tiempo cero se restó de los valores de cada muestra post-inyección. Los valores obtenidos se graficaron en escala semilogarítmica en función del tiempo. Se calculó la constante cinética de primer orden  $K_2$  de eliminación de la emulsión grasa de circulación sanguínea (velocidad de remoción fraccional:  $K_2 \text{ \%min}^{-1}$ ) por el método de los cuadrados mínimos.

### **3.4. Capacidad de utilización de la glucosa por los tejidos "in vivo". Clamp euglucémica-hiperinsulinémica.**

Esta técnica fue utilizada con el fin de determinar la sensibilidad insulínica periférica global como una medida de la resistencia insulínica.

La misma consiste en una infusión simultánea por vía endovenosa de insulina a una velocidad constante y glucosa a velocidad variable con objeto de mantener la euglucemia. Bajo estas condiciones de hiperinsulinemia la producción hepática de glucosa se encuentra inhibida y la secreción basal de insulina no se modifica bajo la infusión de insulina exógena. El músculo esquelético capta aproximadamente el 85-90% de la glucosa total metabolizable (Mandarino, 1989). El hígado y el tejido adiposo juegan un rol mínimo en la utilización (Burnol y col., 1984). En esta situación, la masa de glucosa exógena perfundida equivale a la cantidad de glucosa utilizada por los tejidos periféricos. Al mantener el nivel de glucosa en un valor clampeado luego de la administración de insulina, no solamente se previene reacciones hipoglucémicas sino que no ocurre la compleja respuesta neuroendocrina que sobreviene a la misma.

La clamp euglucémica-hiperinsulinémica fue realizada de acuerdo a la metodología propuesta por De Fronzo y col. (1979) y utilizada en distintos trabajos de nuestro grupo (D'Alessandro y col., 2000).

Brevemente, las ratas ayunadas durante un período de 5 horas fueron anestesiadas y se les colocó una cánula en la vena yugular derecha, a través de la cual se extrajeron muestras de sangre para la determinación de los niveles de glucosa e insulina durante el transcurso de la experiencia. La vena yugular izquierda se canalizó con cánula de doble entrada, infundiéndole por una de ellas insulina (0,8 U/Kg hora) a velocidad constante durante dos horas, por medio de una jeringa de infusión. En toda la experiencia la glucemia fue mantenida en su nivel basal (5,5-6,0 mM, euglucemia) por medio de una



infusión de una solución de glucosa 20% (p/v) a velocidad variable usando una bomba peristáltica (Sage Instruments model 355) conectada a la segunda entrada de la cánula. La infusión de glucosa comenzó a los 5 minutos posteriores a la iniciación de la infusión de insulina.

Previo a comenzar la infusión se extrajo sangre de la vena yugular derecha (tiempo cero), continuando con extracciones a intervalos de 3-5 minutos durante la primer hora y entre 5-7 minutos en la segunda hora de experiencia, determinándose la glucemia utilizando el equipo Accu-Chek Sensor Confort (Roche).

La velocidad de infusión de glucosa (VIG) en el estado estacionario (durante la segunda hora de la clamp) fue considerada como la velocidad de captación periférica global de glucosa y fue expresada como mg glucosa / (Kg . minuto). El hematocrito medido al comienzo y al final de la experiencia se mantuvo constante.

#### 4. REACTIVOS UTILIZADOS.

Enzimas, sustratos y coenzimas utilizados en las técnicas previamente detalladas fueron provistos por SIGMA (St. Louis, MO, USA) o Boehringer Mannheim (Indianapolis, Ind., USA). Los reactivos radiactivos fueron provistos: [1-C<sup>14</sup>] ácido palmítico y [1-C<sup>14</sup>] ácido linoleico por Perkin Eimer (Boston, MA, USA), [1-C<sup>14</sup>] ácido eicosa-8,11,14-trienoico por American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MD, USA). Los demás ácidos grasos sin marcar fueron provistos por Doosan Serdary Research Laboratories (Toronto, Canadá). Los solventes para HPLC fueron obtenidos de Carlo Erba (Milán, Italia). El aceite de hígado de bacalao fue provisto de ICN (Costa Mesa, CA, USA). Los anticuerpos fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). El Intralipid (emulsión grasa 20%) fue obtenido de Kabivitrum (Alameda, CA, USA). Los demás reactivos químicos son de grado analítico (máxima pureza disponible comercialmente).

#### 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES.

El tamaño de las muestras fue calculado en base a las mediciones realizadas previamente en nuestro laboratorio con ratas alimentadas tanto con dieta control (DC) o



dieta rica en sacarosa (DRS) considerando un poder del 80% (Gutman y col., 1987) (Lombardo y col., 1996) (Soria y col., 2002) (Rossi y col., 2005) (Rossi y col., 2009).

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas entre los grupos se determinaron por ANOVA (análisis de varianza), seguidas de la inspección de las diferencias entre pares de medias por el test de Newman Keuls (Snedecor y Cochran, 1967). Valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. En todos los casos los coeficientes de correlación inter-clases fueron al menos de 0,73.

# **RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN**



## RESULTADOS EXPERIMENTALES

Como mencionáramos en el capítulo “Introducción”, ratas normales alimentadas en forma crónica con una dieta rica en sacarosa (DRS) desarrollan dislipidemia (incremento de Tg y AGNE), moderada hiperglucemia y resistencia insulínica (RI) periférica global. Estas alteraciones se acompañan de un moderado incremento de la ingesta calórica que se refleja en un ligero aumento del peso corporal e importante adiposidad visceral.

En estos animales, hemos demostrado previamente que modificando isocalóricamente la fuente grasa dietaria en la DRS, 8% de aceite de maíz (AM) por 7% de aceite de hígado de bacalao (AHB) - rico en ácidos grasos 20:5 n-3 (EPA) y 22:6 n-3 (DHA) - más 1% de aceite de maíz (AM), se normalizó la dislipidemia y se mejoró la homeostasis de la glucosa (Lombardo y col., 1996) (Lombardo y Chicco, 2006). En función de los antecedentes del tema mencionados en el capítulo “Introducción”, los **objetivos generales** desarrollados fueron:

a) estudiar en ratas alimentadas con DRS durante 8 meses, la contribución que realiza el hígado en el desarrollo de la dislipemia, anormal homeostasis de la glucosa y resistencia insulínica,

b) evaluar en el hígado de estos animales, los posibles cambios que puedan inducir los n-3 PUFAs de origen marino en los mecanismos involucrados en la dislipidemia y resistencia insulínica y que logren conducir a un mejoramiento y/o reversión de estas anormalidades.

Para lograr estos objetivos, se alimentaron ratas normales con una DRS durante 6 meses. Al finalizar este período, a la mitad de los animales se les sustituyó el 8% p/p de AM por 7% p/p de AHB más 1% de AM. Los animales controles recibieron durante 8 meses una dieta control (DC). Más detalles de los grupos de animales y componentes de las dietas fueron descriptos en el capítulo “Materiales y Métodos”.



## PARTE 1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO.

En primer lugar analizamos algunos parámetros generales que caracterizan el modelo DRS y la acción del AHB dietario tales como: seguimiento del peso corporal, eficiencia calórica, metabolitos plasmáticos, etc., con el fin de corroborar los resultados previamente demostrados.

### 1.1. Incremento de peso corporal e ingesta calórica.

La ingesta calórica y el peso corporal fueron cuidadosamente monitoreados en los diferentes grupos dietarios a lo largo de todo el período experimental. La **Figura 6** muestra la evolución del peso corporal y la ingesta calórica de las ratas alimentadas con DC, DRS o DRS+AHB. Como puede observarse, las diferentes dietas fueron aceptadas y asimiladas por los animales en forma adecuada.

Durante los tres primeros meses no se registraron variaciones en el peso corporal entre los animales alimentados con DC y DRS. Sin embargo a partir del tercer mes, observamos un paulatino incremento de peso que comienza a ser significativo a partir del sexto mes de ingesta. A los 6 meses, el peso corporal de los animales con DRS alcanzó un incremento de aproximadamente 15-20% con un aumento significativo en la ingesta calórica, comparado con los alimentados con DC. Estas diferencias se mantuvieron al finalizar los 8 meses de ingesta. Por otro lado en el grupo de animales en donde se sustituyó parcialmente el AM por AHB durante los dos últimos meses de ingesta, observamos una moderada reducción en el peso corporal respecto del lote DRS sin llegar a ser significativa. Sin embargo el  $\Delta$  de crecimiento en el peso corporal a partir de los 6-8 meses en el lote DRS+AHB fue significativamente menor que el observado en el lote DC y DRS: media  $\pm$  SEM (n = 8) (DC: 34,3 $\pm$ 5,0; DRS: 32,0 $\pm$ 4,9; DRS+AHB: 16,1 $\pm$ 5,5), (p<0,05) DC y DRS vs DRS+AHB.

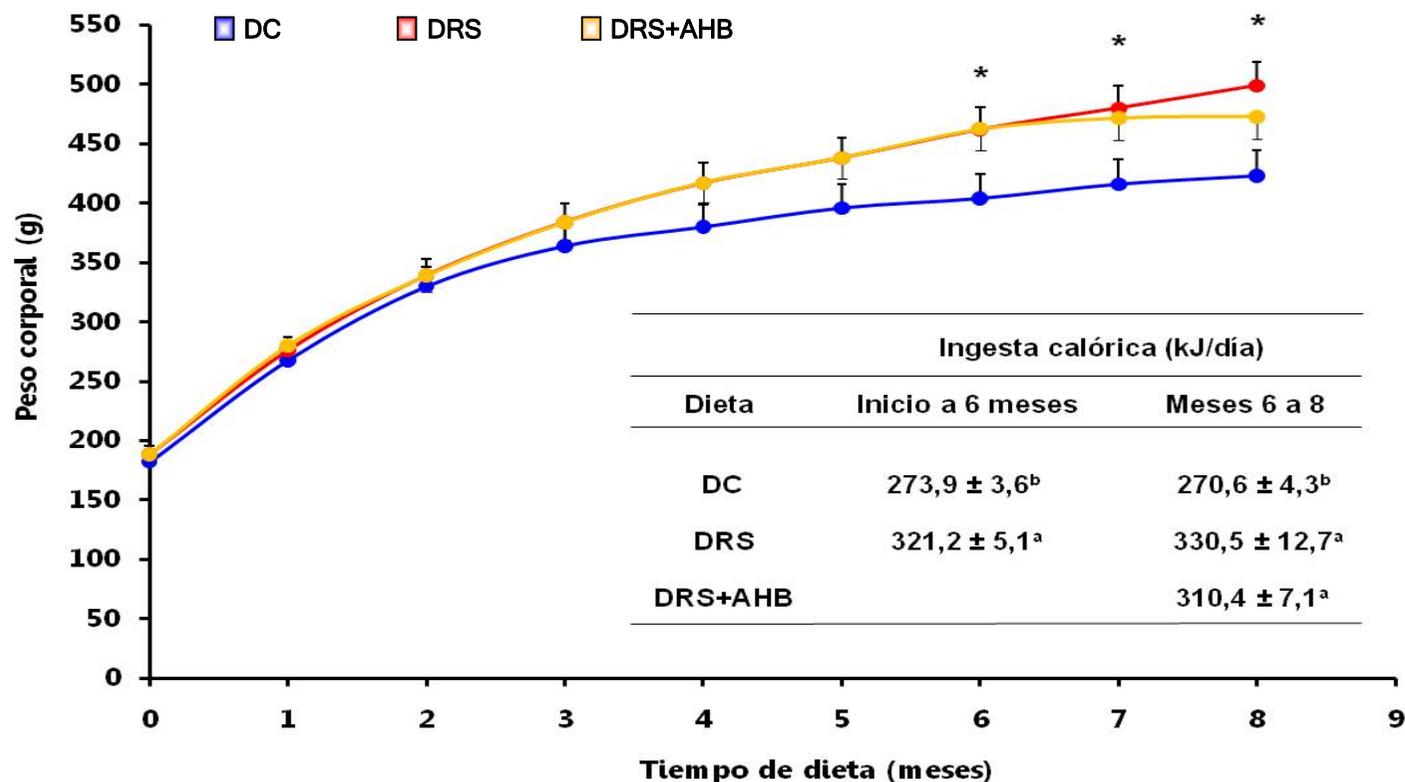
El aumento del peso corporal y de la ingesta calórica constatado en los animales con DRS, se acompaña con un incremento del peso de los tejidos epididimal y retroperitoneal. El peso del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal del grupo DRS incrementó significativamente respecto al grupo DC. La administración de AHB disminuyó sensiblemente (p<0,05) el peso de ambos tejidos sin alcanzar aún los valores obtenidos en el grupo control. Peso total (g) del tejido epididimal: media  $\pm$  SEM (n = 8) (DC: 7,30 $\pm$ 0,79; DRS: 16,91 $\pm$ 0,91; DRS+AHB: 11,80 $\pm$ 0,80), (p<0,05) DRS vs DRS+AHB y



( $p < 0,05$ ) DC vs DRS y DRS+AHB. Peso total (g) del tejido retroperitoneal: media  $\pm$  SEM (n = 8) (DC:  $6,30 \pm 0,51$ ; DRS:  $16,00 \pm 1,08$ ; DRS+AHB:  $11,20 \pm 1,19$ ), ( $p < 0,05$ ) DC vs DRS y DRS+AHB; ( $p < 0,05$ ) DRS vs DRS+AHB.



**Figura 6.** Peso corporal e ingesta calórica de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o dieta rica en sacarosa + aceite de hígado de bacalao (DRS+AHB).



Los valores se expresan como media ± SEM (n = 6). \* p<0,05, DRS y DRS+AHB vs DC. Los valores en cada columna con letras supraescritas diferentes son significativamente diferentes (p<0,05) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.



## 1.2. Determinaciones plasmáticas y contenido de triglicéridos hepáticos.

En la **Tabla 4** se muestran los parámetros plasmáticos y el contenido de Tg hepáticos de los diferentes grupos dietarios, que confirman los resultados obtenidos en trabajos anteriores del grupo (Pighin y col., 2003) (Lombardo y col., 2007). Al finalizar el período de ingesta los niveles plasmáticos de triglicéridos, AGNE, glucosa, colesterol total, junto con el contenido de triglicéridos hepáticos, fueron significativamente más altos en ratas alimentadas con DRS en comparación a las que recibieron DC ( $p < 0,05$ ). Mediante la sustitución de la fuente grasa dietaria durante los últimos dos meses de ingesta (AM por AHB+AM), se lograron normalizar todos los metabolitos previamente descriptos. La insulinemia no se modificó en ninguno de los lotes.

Por otro lado, el aumento observado en la **Tabla 4** en los triglicéridos plasmáticos y hepáticos de ratas dislipidémicas se vio acompañado de un aumento significativo en la velocidad de secreción de VLDL-Tg y una menor remoción de los triglicéridos plasmáticos ( $p < 0,05$ ). Mediante la administración de AHB, la velocidad de secreción de VLDL-Tg disminuyó, alcanzando niveles inferiores al lote con DC. La remoción de triglicéridos plasmáticos alcanzó valores similares al lote control. Los resultados obtenidos fueron los siguientes, media  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ): Velocidad de secreción de VLDL-Tg (nmol/100g/min): (DC:  $161,5 \pm 3,0$ ; DRS:  $194,6 \pm 8,5$ ; DRS+AHB:  $120,3 \pm 9,5$ ), ( $p < 0,05$ ) DC vs DRS y DRS+AHB; ( $p < 0,05$ ) DRS vs DRS+AHB. Velocidad de remoción plasmática de triglicéridos ( $K_2 \text{ } \% \text{ min}^{-1}$ ): (DC:  $10,4 \pm 0,7$ ; DRS:  $4,8 \pm 0,5$ ; DRS+AHB:  $8,9 \pm 0,3$ ), ( $p < 0,05$ ) DC y DRS+AHB vs DRS.



**Tabla 4.** Niveles plasmáticos de triglicéridos, ácidos grasos no esterificados (AGNE), glucosa, colesterol total e insulina y contenido de triglicéridos hepáticos en ratas alimentadas con DC, DRS o DRS+AHB al final del período experimental.

	DC	DRS	DRS+AHB
Insulina ( $\mu\text{U/ml}$ )	$56,1 \pm 3,4^a$	$63,7 \pm 4,5^a$	$54,4 \pm 1,9^a$
Glucosa (mM)	$6,6 \pm 0,2^b$	$8,1 \pm 0,1^a$	$6,5 \pm 0,2^b$
Colesterol Total (mg/dl)	$84,4 \pm 2,0^b$	$134,7 \pm 0,8^a$	$80,0 \pm 4,4^b$
Triglicéridos (mM)	$0,9 \pm 0,1^b$	$2,2 \pm 0,1^a$	$1,0 \pm 0,1^b$
AGNE ( $\mu\text{M}$ )	$270 \pm 10^b$	$728 \pm 29^a$	$307 \pm 38^b$
Triglicéridos hepáticos ( $\mu\text{mol/g TH}$ )	$15,3 \pm 0,2^b$	$24,8 \pm 1,6^a$	$16,1 \pm 0,3^b$

Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Los valores en cada fila con letras supraescritas diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.



### 1.3. Sensibilidad insulínica periférica global: Velocidad de Infusión de Glucosa (VIG) (clamp euglucémica-hiperinsulinémica).

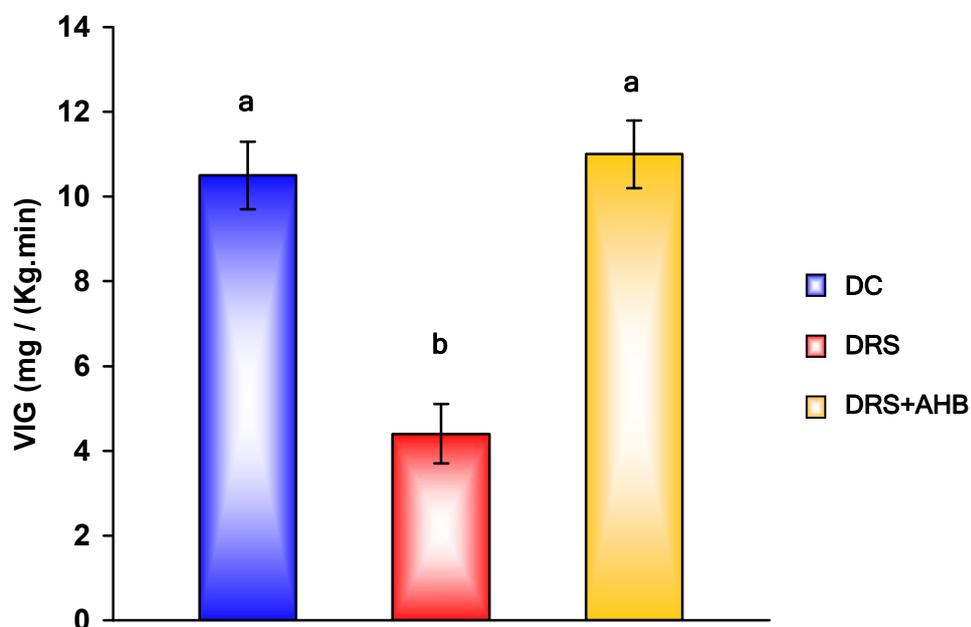
Con el fin de corroborar la sensibilidad insulínica periférica global, se realizó una clamp euglucémica-hiperinsulinémica en animales pertenecientes a los tres grupos dietarios. Luego de 5 horas de ayuno, los niveles de glucemias postprandiales fueron (mM) media  $\pm$  SEM (n = 8): (DC:  $5,61 \pm 0,29$ ; DRS:  $8,12 \pm 0,30$ ; DRS+AHB:  $6,01 \pm 0,21$ ). Los niveles plasmáticos de insulina obtenidos en estas condiciones fueron similares a aquellos observados al final del período de oscuridad (basales) (datos no mostrados).

La VIG obtenida en el estado estacionario fue significativamente inferior ( $p < 0,01$ ) en los animales alimentados con DRS en comparación con aquellos de igual sexo y edad alimentados con DC (**Figura 7**). Estos resultados corroboran un importante deterioro de la sensibilidad insulínica periférica global en los animales alimentados con DRS. En el lote tratado con AHB, la sensibilidad insulínica periférica global se normalizó.

No se observaron cambios significativos en el hematocrito de los animales de los tres grupos experimentales durante el transcurso de la clamp (datos no mostrados).



**Figura 7.** Velocidad de infusión de glucosa (VIG) en ratas alimentadas con DC, DRS ó DRS+AHB al final del período experimental<sup>1</sup>.



	DC	DRS	DRS+AHB
<b>Glucosa (mM)</b>	5,70 ± 0,24	5,90 ± 0,29	5,98 ± 0,06
<b>Insulina (μU/ml)</b>	702 ± 39	762 ± 36	716 ± 35

<sup>1</sup>Los valores se expresan como media ± SEM. Al menos 5 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls. Glucosa e Insulina: Los valores representan los niveles alcanzados en el estado estacionario durante los últimos 60 minutos de la clamp euglucémica-hiperinsulinémica.



Los resultados descriptos hasta el presente, sumado a los observados en trabajos previos de nuestro grupo (Chicco y col., 2003) (Lombardo y col., 2007) nos permiten corroborar que la administración crónica de una DRS (62,5%) conduce, en términos generales, a dislipidemia (elevados niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol total y ácidos grasos), moderada hiperglucemia y normoinsulinemia con pronunciada resistencia insulínica periférica global (disminución del VIG). La hipertrigliceridemia se acompaña de una menor secreción hepática de VLDL-Tg y disminuida remoción plasmática de triglicéridos.

La sustitución parcial de la fuente grasa dietaria (AM rico en ácidos grasos n-6, por AHB rico en ácidos grasos n-3) durante los 2 últimos meses de ingesta, normalizó el perfil lipídico y la homeostasis de la glucosa sin modificar los niveles plasmáticos de insulina. Además es importante destacar que la ganancia de peso, registrada en los animales alimentados con DRS+AHB, fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) comparado con el grupo con DRS y con DC.



## PARTE 2. ESTUDIO DE ALGUNOS MECANISMOS A NIVEL HEPÁTICO QUE ANALIZAN EL DESTINO METABÓLICO DE LA MAYOR DISPONIBILIDAD DE AGNE PLASMÁTICOS Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA INSULÍNICA.

Una vez corroborado el modelo el siguiente objetivo fue analizar algunos mecanismos involucrados, a nivel enzimático y molecular, que conducen a la dislipemia y a su normalización por la administración de AHB.

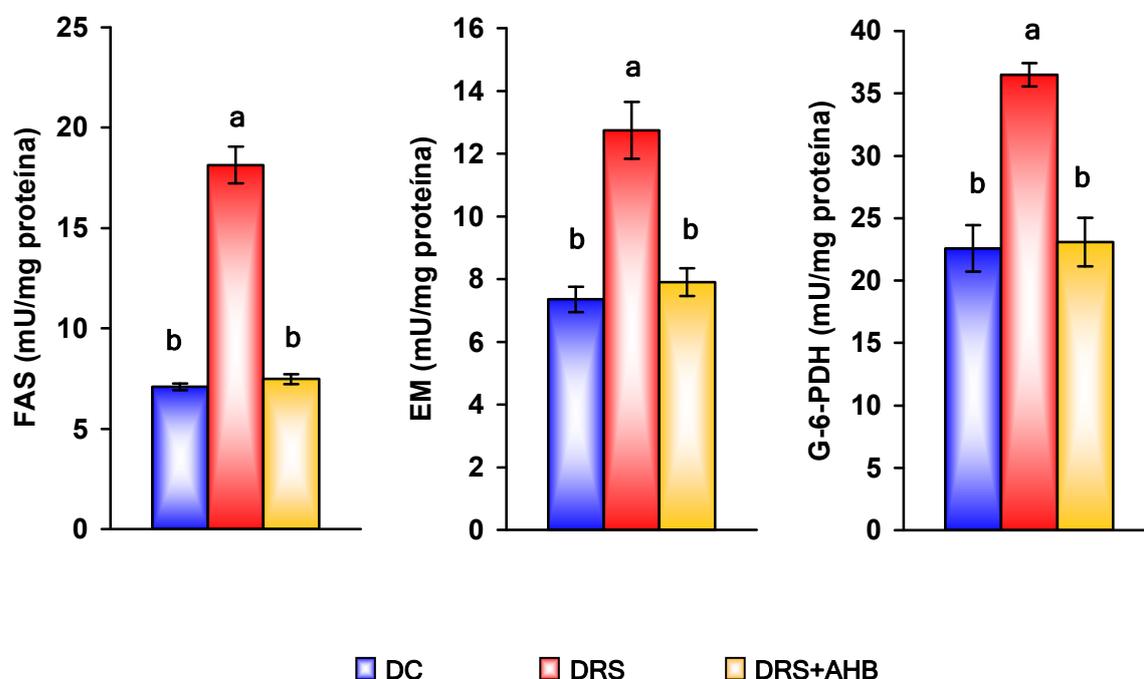
En este contexto y por lo anteriormente expuesto, el siguiente propósito del presente trabajo fue estudiar en ratas alimentadas crónicamente con DRS (8 meses) y en los animales a los que se les sustituyó la fuente grasa AM por AHB+AM, las actividades de enzimas claves involucradas en la lipogénesis hepática (FAS, ME y G-6-PDH) y en la oxidación de ácidos grasos (carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT 1) y oxidasa de ácidos grasos (FAO)). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

### 2.1. Actividades de enzimas lipogénicas.

En la **Figura 8** se observan la actividad de enzimas involucradas en la síntesis “*de novo*” de AG: sintasa de ácidos grasos (FAS), enzima málica (EM) y glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa (G-6-PDH). La DRS produjo en hígado, un incremento significativo de las actividades de enzimas lipogénicas ( $p < 0,05$ ) en comparación con animales alimentados con dieta control (DC), lo que sugiere una inducción en la síntesis “*de novo*” de ácidos grasos. La actividad G-6-PDH (que produce NADPH citosólico, cofactor importante en la biosíntesis de AGNE) también incrementó. Cuando el AHB reemplazó al AM como fuente grasa dietaria, se normalizaron las actividades de las enzimas lipogénicas alcanzando valores semejantes al grupo control.



**Figura 8.** Actividades de las enzimas: sintasa de ácidos grasos (FAS), enzima málica (EM) y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-PDH) en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del período experimental.



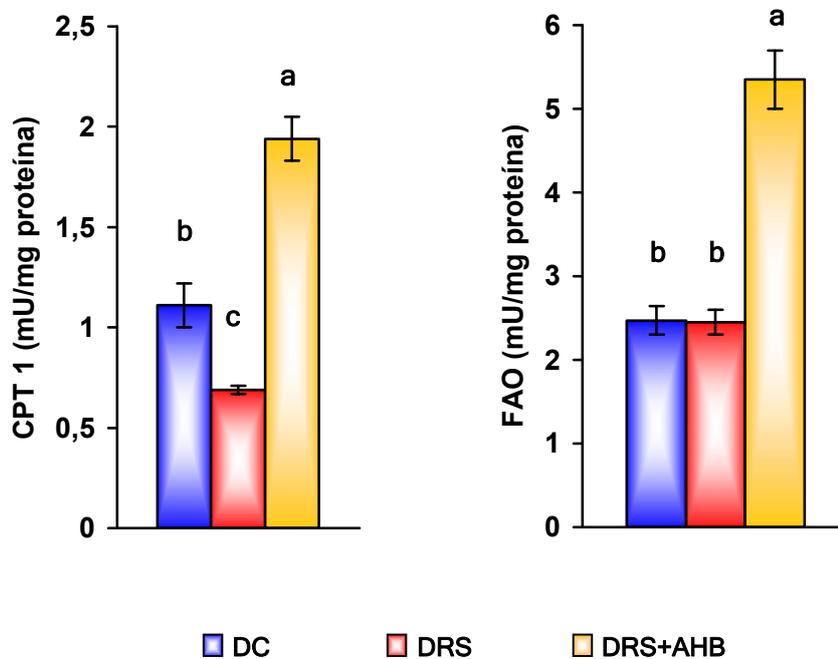
Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

## 2.2. Actividades de enzimas de la oxidación de ácidos grasos.

Al analizar la actividad de las enzimas pro-oxidativas FAO y CPT 1, observamos en la **Figura 9** que los animales alimentados con DRS exhibieron una actividad CPT 1 significativamente menor ( $p < 0,05$ ), sin variación en los niveles de FAO respecto a los animales que recibieron dieta control. Mientras que la administración de AHB incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) las actividades de ambas enzimas (FAO y CPT 1).



**Figura 9.** Actividades de las enzimas: carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT 1) y oxidasa de ácidos grasos (FAO) en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del periodo experimental.



Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

### 2.3. Expresión de la masa proteica de los receptores nucleares PPAR- $\alpha$ y LXR- $\alpha$ .

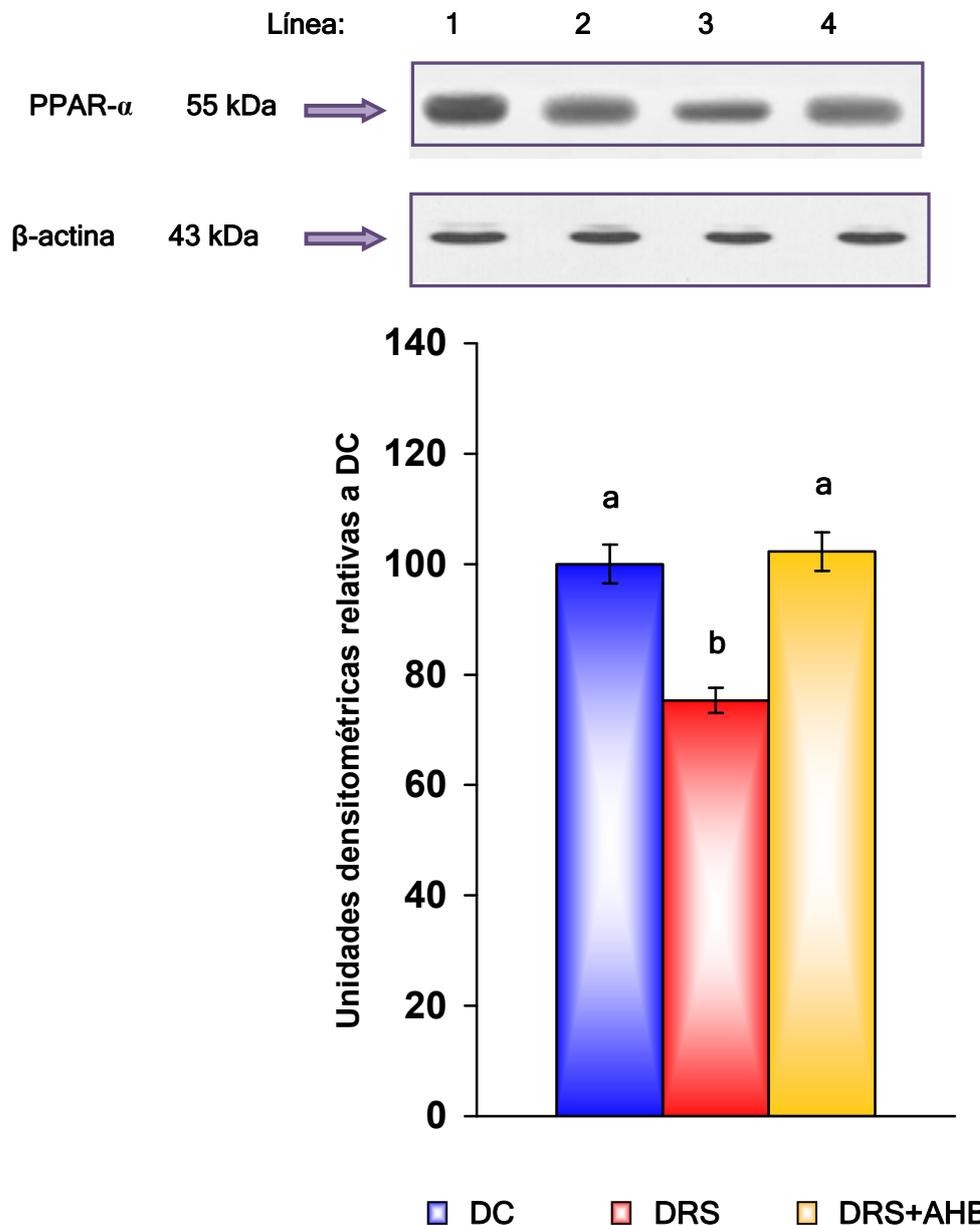
A partir de los resultados obtenidos nos interesó analizar el efecto que tiene la DRS y la sustitución parcial en la misma de la fuente grasa dietaria (AM por AHB) sobre la expresión los factores de transcripción PPAR- $\alpha$  y LXR- $\alpha$ . En la **Figura 10** observamos una disminución de la masa proteica del PPAR- $\alpha$  en los animales con DRS que logró alcanzar niveles semejantes a los animales de igual sexo y edad alimentados con DC, bajo la administración de AHB. Estos resultados demuestran que un aumento en las actividades lipogénicas (**Figura 8**), corresponde a una disminución de la masa proteica del receptor nuclear PPAR- $\alpha$  en los animales con DRS. La **Figura 11** muestra el incremento



significativo en la masa proteica del LXR- $\alpha$  en los animales con DRS ( $p < 0,05$ ). El AHB logró reducir la masa de este receptor en los animales alimentados con DRS+AHB. Por lo tanto los n-3 PUFAs, a través de la activación del PPAR- $\alpha$  y la disminución del LXR- $\alpha$ , serían capaces de contribuir con la reversión de la incrementada lipogénesis *de novo* en los animales alimentados con DRS).



**Figura 10.** Expresión de la masa proteica del PPAR- $\alpha$  en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del período experimental.

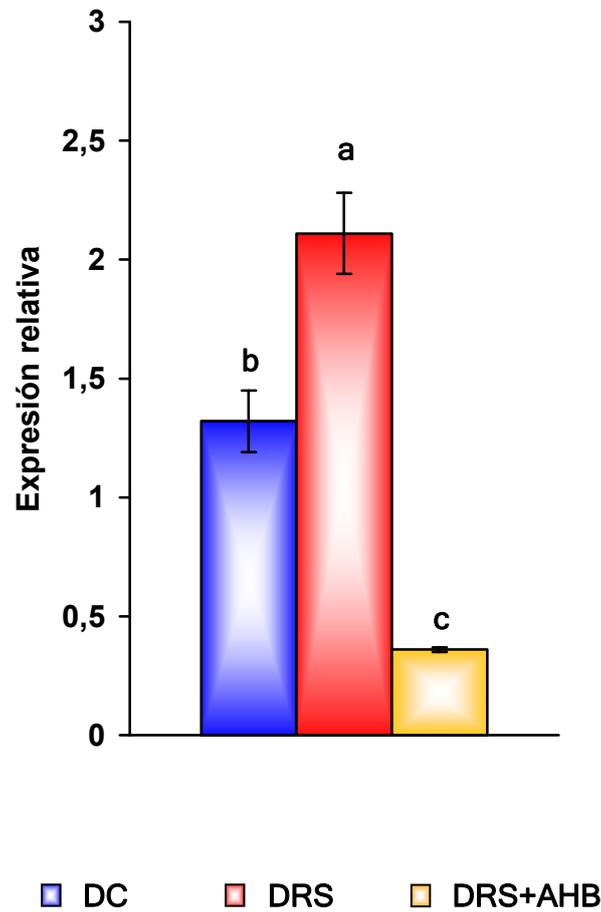


*Panel superior:* Inmunoblots del PPAR- $\alpha$  hepático y  $\beta$ -actina de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB. El marcador molecular se indica a la izquierda; Línea 1: extracto de riñón utilizado como control positivo; Línea 2: DC; Línea 3: DRS; Línea 4: DRS+AHB.

*Panel inferior:* Análisis densitométrico de la masa proteica del PPAR- $\alpha$  en tejido hepático. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 5) relativos a DC. Los valores de masa proteica del PPAR- $\alpha$  fueron corregidos por los niveles de  $\beta$ -actina presentes en cada una de las muestras. Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.



**Figura 11.** Expresión de la masa proteica de LXR- $\alpha$  hepático de ratas alimentadas con DC, DRS ó DRS+AHB al final del período experimental.



Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) (unidades arbitrarias). Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls. Los valores de masa proteica del LXR- $\alpha$  fueron corregidos por los niveles de  $\beta$ -actina presentes en cada una de las muestras.



Los resultados obtenidos hasta el presente en este modelo experimental se adicionan a trabajos previos de nuestro grupo que demostraron cambios en la expresión (ARNm) y actividad de las SCD-1,  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas hepáticas y que condujeron a modificaciones en la proporción de ácidos grasos polinosaturados en este tejido (Brenner y col., 2003) (Montanaro y col., 2005). Esto nos indujo a investigar el efecto de la sustitución parcial del AM por AHB sobre estos aspectos.

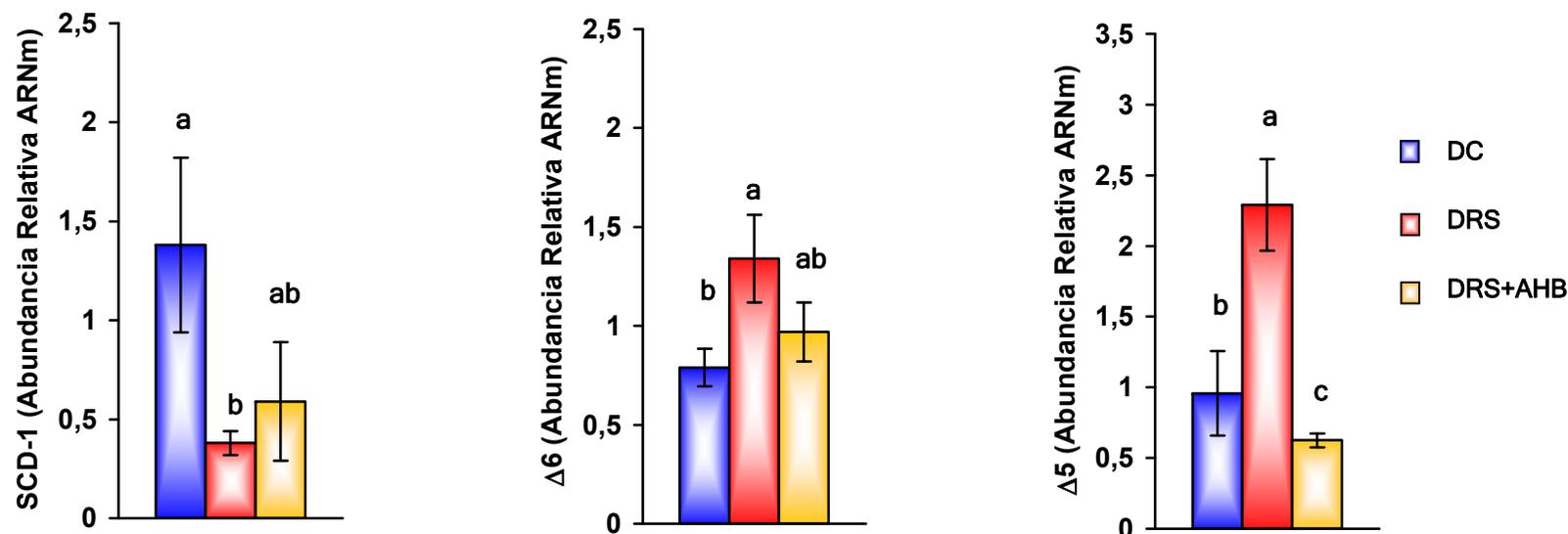
#### 2.4. Efecto de la DRS sobre la expresión y actividades enzimáticas de SCD-1, $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas. Acción del AHB.

La ingesta crónica de sacarosa produjo a nivel hepático, una disminución en la transcripción del ARNm de la SCD-1 (**Figura 12**). Esta disminución se asocia a un descenso no significativo de la actividad enzimática, como se puede apreciar en la **Tabla 5**. Si bien la adición de AHB a la DRS incrementó ligeramente tanto la expresión como la actividad enzimática de la SCD-1, estos niveles son semejantes tanto a la DRS como al grupo con DC.

Por otra parte, la biosíntesis de PUFA de 20 carbonos se origina de las familias n-6 y n-3 de ácidos grasos y está regulada principalmente en el hígado por las actividades de  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas. Al respecto, la **Figura 12** y la **Tabla 5** muestran que la expresión (ARNm) de dichas enzimas se ven incrementadas por la DRS. Esto se acompañó de un incremento significativo en la actividad  $\Delta 6$  y un ligero incremento de la actividad  $\Delta 5$ . Mediante la sustitución de la fuente grasa en la dieta (AM por AHB), el ARNm de la enzima  $\Delta 5$  desaturasa disminuyó significativamente sin verse afectada su actividad. El ARNm y actividad de la  $\Delta 6$  desaturasa no se modificó en el grupo con DRS+AHB con respecto al grupo DRS (**Figura 12 y Tabla 5**).



**Figura 12.** Expresión de ARNm de SCD-1, Δ6 y Δ5 desaturasas en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS o DRS+AHB al final del período experimental.



Los valores se expresan como media ± SEM (n = 4); (unidades arbitrarias). Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes (p<0,05) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

**Tabla 5.** Actividades de SCD-1, Δ6 y Δ5 desaturasas de microsomas hepáticos de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del período experimental.

	DC	DRS	DRS+AHB
SCD-1 (mU/mg proteína)	0,223 ± 0,019 <sup>a</sup>	0,158 ± 0,019 <sup>a</sup>	0,172 ± 0,012 <sup>a</sup>
Δ6 (mU/mg proteína)	0,085 ± 0,012 <sup>b</sup>	0,221 ± 0,019 <sup>a</sup>	0,171 ± 0,011 <sup>a</sup>
Δ5 (mU/mg proteína)	0,097 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,118 ± 0,010 <sup>a</sup>	0,115 ± 0,006 <sup>a</sup>

Los valores se expresan como media ± SEM (n = 4). Los valores en cada fila con letras supraescritas diferentes son significativamente diferentes (p<0,05) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.



## 2.5. Efecto de la DRS sobre el contenido y la composición de AG en lípidos hepáticos. Acción del AHB.

Se pudo observar un incremento significativo de los AGL en el hígado de ratas alimentadas en forma crónica con DRS ( $p < 0,05$ ). Mediante la administración de AHB, los AGL disminuyeron alcanzando concentraciones aún menores ( $p < 0,05$ ) respecto del grupo con DC. Los valores de AGL hepáticos, expresados en mg/100 g tejido húmedo, en animales que fueron alimentados con las diferentes dietas fueron los siguientes: media  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ), (DC:  $466,2 \pm 15,3$ ; DRS:  $532,0 \pm 17,1$ ; DRS+AHB:  $377,0 \pm 12,8$ ); ( $p < 0,05$ ) DRS vs DC y DRS+AHB; ( $p < 0,05$ ) DC vs DRS+AHB.

Las **Tablas 6 y 7** muestran las modificaciones en la composición de ácidos grasos, tanto en los lípidos hepáticos totales como en los fosfolípidos microsomales, luego de la administración crónica de DRS a los animales de experimentación. En ambos sitios la proporción de ácido palmítico se vio ligeramente disminuida, a pesar del incremento de las actividades de FAS, EM y G-6-PDH que sugiere un efecto opuesto (**Figura 8**). Mientras que la proporción de ácidos monoenoicos 16:1 y 18:1 no se vio modificada, a pesar de la disminución del ARNm de SCD-1 (**Figura 12 y Tabla 5**). Por lo tanto estos resultados demuestran que los cambios producidos en las actividades enzimáticas mencionadas, no debe ser el único factor que podría modificar la proporción de ácidos grasos saturados y monoenoicos y además que la DRS induce mecanismos compensatorios como una posible competencia de lo PUFA en la conformación de las moléculas lipídicas. Al respecto, la DRS provoca incrementos significativos de los ácidos grasos 20:4 n-6, 22:4 n-6 y 22:5 n-6 a expensas del 18:2 dietario y concuerda con los incrementos del ARNm de  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas y la actividad de  $\Delta 6$  desaturasa (**ver Tabla 3 "Materiales y Métodos"**).

A pesar de la proporción de AG n-3, los ácidos 20:5 n-3, 22:5 n-3 y 22:6 n-3 disminuyeron en el lote con DRS. Esta típica disminución de los n-3 PUFAs, a pesar de la activación de las desaturasas, ha sido demostrado previamente en este modelo (Montanaro y col., 2007). Pero en este caso en particular, resulta importante señalar que la proporción de los precursores n-6 y n-3 PUFAs en la dieta, ácido linoleico y  $\alpha$ -linolénico respectivamente, fue muy diferente -51,5% ácido linoleico y 0,4% ácido  $\alpha$ -linolénico- (**ver Tabla 3 "Materiales y Métodos"**). Consecuentemente la competencia de ambos ácidos grasos por la  $\Delta 6$  desaturasa, sería a favor de la desaturación del ácido linoleico y la biosíntesis de n-6 PUFAs.



**Tabla 6.** Composición de AG en homogeneizado hepático (%p/p) de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del período experimental.

Ácidos Grasos	DC	DRS	DRS+AHB
16:0	21,74 ± 0,23 <sup>a</sup>	19,19 ± 0,39 <sup>a</sup>	22,06 ± 0,35 <sup>a</sup>
16:1 n-7	1,96 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,17 <sup>a</sup>	2,01 ± 0,20 <sup>a</sup>
18:0	14,09 ± 0,40 <sup>b</sup>	16,17 ± 0,49 <sup>a</sup>	15,87 ± 0,37 <sup>b</sup>
18:1 n-9	13,02 ± 0,63 <sup>a</sup>	11,88 ± 0,94 <sup>a</sup>	10,63 ± 0,62 <sup>a</sup>
18:2 n-6	21,12 ± 0,93 <sup>a</sup>	17,77 ± 0,56 <sup>b</sup>	16,47 ± 0,29 <sup>b</sup>
20:4 n-6	16,67 ± 0,63 <sup>b</sup>	22,92 ± 0,78 <sup>a</sup>	10,81 ± 0,42 <sup>c</sup>
20:5 n-3	0,62 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,08 <sup>c</sup>	4,59 ± 0,33 <sup>a</sup>
22:4 n-6	0,30 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,09 ± 0,04 <sup>a</sup>	
22:5 n-6	0,23 ± 0,07 <sup>b</sup>	2,83 ± 0,08 <sup>a</sup>	
22:5 n-3	1,09 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,44 ± 0,10 <sup>c</sup>	2,02 ± 0,10 <sup>a</sup>
22:6 n-3	5,71 ± 0,33 <sup>b</sup>	2,71 ± 0,29 <sup>c</sup>	11,42 ± 0,20 <sup>a</sup>

Los valores se expresan como media ± SEM (n = 5). Los valores en cada fila con letras supraescritas diferentes son significativamente diferentes (p<0,05) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

**Tabla 7.** Composición de AG en fosfolípidos microsomales hepáticos (%p/p) de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del período experimental.

Ácidos Grasos	DC	DRS	DRS+AHB
16:0	20,26 ± 0,33 <sup>a</sup>	18,65 ± 0,21 <sup>a</sup>	21,20 ± 0,43 <sup>a</sup>
16:1 n-7	0,84 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,16 <sup>a</sup>
18:0	20,44 ± 0,46 <sup>a</sup>	20,81 ± 0,25 <sup>a</sup>	20,65 ± 0,32 <sup>a</sup>
18:1 n-9	6,44 ± 0,11 <sup>a</sup>	6,86 ± 0,29 <sup>a</sup>	6,34 ± 0,26 <sup>a</sup>
18:2 n-6	13,53 ± 0,68 <sup>b</sup>	11,37 ± 0,50 <sup>c</sup>	14,08 ± 0,38 <sup>a</sup>
20:4 n-6	24,68 ± 0,46 <sup>b</sup>	29,56 ± 0,29 <sup>a</sup>	14,82 ± 0,58 <sup>c</sup>
20:5 n-3	0,38 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,05 <sup>c</sup>	4,04 ± 0,36 <sup>a</sup>
22:4 n-6	0,24 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,14 ± 0,04 <sup>a</sup>	Trazas
22:5 n-6	0,25 ± 0,04 <sup>b</sup>	3,38 ± 0,17 <sup>a</sup>	Trazas
22:5 n-3	1,31 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,62 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,86 ± 0,07 <sup>a</sup>
22:6 n-3	7,84 ± 0,25 <sup>b</sup>	3,28 ± 0,21 <sup>c</sup>	12,59 ± 0,23 <sup>a</sup>

Los valores se expresan como media ± SEM (n = 5). Los valores en cada fila con letras supraescritas diferentes son significativamente diferentes (p<0,05) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.



La incorporación del AHB a la dieta produjo cambios notables en la composición n-6 y n-3 PUFAs de los lípidos hepáticos (**Tabla 6 y 7**). El aceite de pescado, como es de esperarse, incrementó la proporción de todos los n-3 PUFAs: 20:5 n-3, 22:5 n-3 y 22:6 n-3 en el tejido hepático. Sin embargo, aunque los principales componentes del AHB: 20:5 n-3 (9,0%) y 22:6 n-3 (8,1%) fueron provistos por la dieta, el mayor incremento (mayor a 60 veces en DRS+AHB) se registró en el ácido eicosapentanoico (20:5 n-3). Por el contrario, se vio solamente el doble de incremento para el 22:5 n-3 y cuatro veces para el 22:6 n-3. No obstante, la cantidad de ácido graso 22:6 n-3 incorporado en los lípidos de ratas alimentadas con DRS+AHB fue aproximadamente el doble del 20:5 n-3.

El ácido araquidónico (20:4 n-6), principal AG n-6 constituyente de los lípidos hepáticos, disminuyó aproximadamente hasta la mitad en las ratas alimentadas con DRS+AHB. Los otros componentes menores de la familia n-6 (22:4 n-6 y 22:5 n-6) solamente se encuentran presentes como trazas en los microsomas hepáticos.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el ácido araquidónico (20:4 n-6, y los otros ácidos grasos menores de la familia n-6) no son suministrados directamente por la dieta y su presencia en los lípidos hepáticos se debe a un proceso de biosíntesis a partir del ácido linoleico dietario. La disminución del 20:4 n-6, debe ser atribuida en primer lugar a una menor provisión en la dieta de ácido linoleico; este efecto está claramente comprobado al comparar la proporción de ácido linoleico en la comida de los animales alimentados con y sin aceite de pescado -9,0% y 51,5%, respectivamente- (ver **Tabla 3** "Materiales y Métodos"). En segundo lugar una disminución en las actividades de  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas podrían contribuir a la menor biosíntesis de dichos AG; sin embargo los resultados obtenidos demuestran que las actividades de ambas desaturasas no se vieron disminuidas por la administración de AHB a los animales con DRS. Solamente pudimos registrar una disminución del ARNm de la  $\Delta 5$  desaturasa en los animales del lote DRS+AHB.

Por otro lado, el desplazamiento de los n-6 PUFAs por los n-3 PUFAs podría ser a través de un mecanismo de competencia directa. Al respecto, la **Tabla 8** muestra el efecto producido por el aceite de pescado sobre la composición y distribución de algunas especies moleculares. Las principales especies moleculares de fosfatidilcolina en ratas con DRS son 16:0/20:4 y 18:0/20:4. Estas especies disminuyeron significativamente por la administración del aceite de pescado. Además se incrementaron las especies 16:0/22:6, demostrando un desplazamiento competitivo del 20:4 n-6 por el 22:6 n-3 en las moléculas



correspondientes de fosfolípidos que tienen unido al carbono 1 el ácido palmítico. Por lo tanto el principal mecanismo por el cual el AHB modifica la composición de PUFAs en los lípidos hepáticos de ratas con DRS (DRS+AHB), resulta de las cantidades relativas y la correspondiente competencia entre los n-6 y n-3 PUFA.

**Tabla 8.** Principales especies moleculares de fosfatidilcolina de microsomas hepáticos (%p/p) de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del período experimental.

Especies Moleculares	DC	DRS	DRS+AHB
16:0 / 22:6	8,20 ± 0,30 <sup>b</sup>		15,05 ± 0,90 <sup>a</sup>
16:0 / 20:4	37,38 ± 0,86 <sup>b</sup>	50,67 ± 2,45 <sup>a</sup>	19,59 ± 1,51 <sup>c</sup>
16:0 / 18:2	13,80 ± 1,64 <sup>b</sup>	14,25 ± 3,99 <sup>b</sup>	26,40 ± 1,09 <sup>a</sup>
18:0 / 20:4	24,97 ± 3,79 <sup>a</sup>	35,08 ± 5,08 <sup>a</sup>	12,73 ± 1,04 <sup>b</sup>
18:0 / 18:2	9,79 ± 1,63 <sup>b</sup>		12,39 ± 0,72 <sup>a</sup>

Los valores se expresan como media ± SEM (n = 5). Los valores en cada fila con letras supraescritas diferentes son significativamente diferentes (p<0,05) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

El aceite de pescado, además de la relevante modificación que provoca en la relación n-6/n-3 PUFAs de lípidos hepáticos, también provoca un pequeño incremento en la proporción del ácido graso 16:0 en los lípidos de ratas con DRS+AHB (Tablas 6 y 7). Este incremento específico de ácido palmítico en ratas alimentadas con AHB resulta difícil de explicar en vista a su similar proporción presente en AM como en AHB (11% aprox.). Más aún, las enzimas involucradas en la lipogénesis *de novo* (FAS, EM, G-6-PDH) disminuyeron por la administración del aceite de pescado (Figura 10).



## DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo corroboran que la alimentación con una DRS a ratas normales durante un largo período de tiempo, induce RI, moderada hiperglucemia en presencia de normoinsulinemia, dislipemia (elevados Tg y AGNE), junto a un incrementado contenido de Tg hepáticos (Lombardo y col., 2007).

Los AGL y los PPARs están involucrados en la insulino resistencia mientras que por otro lado, la insulina, los glucocorticoides y los AGNE regulan la expresión de los PPARs (Desvergne y Wahli, 1999) (Brenner y col., 2003). La DRS produjo una activación de las enzimas hepáticas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos (FAS, EM y G-6-PDH) y una disminución en la actividad de la enzima de oxidación mitocondrial CPT 1, sin modificaciones en la actividad de la enzima peroxisomal FAO. Este balance favorece la lipogénesis.

Mientras que el isotipo PPAR- $\gamma$  se expresa principalmente en el tejido adiposo y regula la expresión de genes involucrados en la diferenciación de adipocitos y las reservas de grasas y glucosa (Berger y col., 1999), PPAR- $\alpha$  se expresa en gran medida en el hígado y regula genes implicados en la oxidación mitocondrial, peroxisomal y microsomal de ácidos grasos (Desvergne y Wahli, 1999) (Desvergne y col., 2006). Al respecto, la DRS produjo una disminución significativa en la masa del PPAR- $\alpha$  y en la actividad de CPT 1 sin variación de la FAO. Ambas enzimas poseen elementos de regulación de PPAR identificados (Desvergne y Wahli, 1999), por lo cual, estos resultados sugieren que la lipogénesis inducida por la DRS se favorecería por la disminución del PPAR- $\alpha$ .

Acorde a estos resultados, Nagay y col. (2002) encontraron que la alimentación a ratas con una dieta rica en fructosa también produjo, una disminución en la masa proteica y actividad del PPAR- $\alpha$ , reduciendo la oxidación de AG. Este efecto se revirtió mediante la administración de fenofibrato, el cual resulta ser un agonista xenobiótico de este receptor nuclear. Resultados similares fueron obtenidos por Qu y col. (2007) en hamsters alimentados con fructosa. Ellos demostraron, que la activación del PPAR- $\alpha$  por el fenofibrato también antagoniza la acción del Fox O1 sobre la expresión de la apolipoproteína C-3 hepática, lo que lleva a una aumento del metabolismo de triglicéridos disminuyendo la hipertrigliceridemia.



Por otro lado, la DRS incrementó los niveles de AGNE plasmáticos y el contenido de AG hepáticos, y estos AG mostraron una alta proporción de n-6 PUFAs. Estos PUFAs se unen particularmente al dominio de activación dependiente de ligando (LBD) del PPAR- $\alpha$  (Desvergne y Wahli, 1999) (Neschen y col., 2002), por lo tanto sería de esperar que éstos ácidos grasos provocaran la activación del PPAR- $\alpha$  que no hemos comprobado en el presente estudio. El mecanismo fisiológico por el cual los AG producen la activación del PPAR- $\alpha$  no está claro aún, pero hallazgos recientes podrían ayudar a revelar este mecanismo (Sanderson y col., 2008). Muchos factores pueden elevar los AGNEs plasmáticos y hepáticos. El ayuno por ejemplo se asocia con un incremento en la lipólisis del tejido adiposo, originando un aumento de estos AG. Pero Sanderson y col. (2008), empleando la ventaja que ofrece el modelo murino PPAR- $\alpha$  -/- pudo demostrar que: a) el PPAR- $\alpha$  no media realmente el efecto de los AG plasmáticos sobre la expresión de genes hepáticos durante el ayuno; b) la inducción de genes target del PPAR- $\alpha$  durante el ayuno podría estar relacionado a una “up regulación” del coactivador PPARGC-1 $\alpha$ ; c) los AG dietarios, a diferencia de los AG endógenos del plasma podrían ser ligandos activadores del PPAR- $\alpha$  en el hígado. Por lo tanto, Sandersoy y col. (2008) propusieron que en el hígado los PPARs son activados en forma diferencial de acuerdo al origen del pool de lípidos. Por lo que el efecto de los agonistas dependería y podría ser modificado por un efecto de compartimentalización. No solo el tipo de AG insaturado o el acil-CoA, sino también su unión con la proteína de unión de ácidos grasos del hígado (L-FABP) que media su entrada al núcleo celular y lo direcciona hacia el PPAR- $\alpha$ , podrían ser determinantes (Schoroeder y col., 2008) (Wolfrum y col., 2001).

Más aun, nosotros encontramos que la DRS mejora la expresión del LXR- $\alpha$  in vivo y se relaciona con un incremento en los AGNEs. Pero Paward y col. (2002), en un estudio in vitro empleando células HEK 293-E y HEK 293-L, observaron que la adición de AG insaturados suprimen la “up regulación”-(dependiente de oxisteroles) de la actividad del LXR- $\alpha$ . El efecto se produce por la unión del AG con el dominio LBD del LXR- $\alpha$ , en el siguiente orden: 20:4 n-6 = 22:6 n-3 > 20:5 n-3 > 18:1 n-9 = 18:3 n-3. Por lo tanto, el incremento de los AGNEs por la DRS en primera instancia, considerando los resultados de Paward y col., conduciría a una disminución en la actividad del LXR- $\alpha$  y no a un incremento como el encontrado en este trabajo. Sin embargo, la Figura 11 muestra que el incremento en la masa proteica del LXR- $\alpha$  por la DRS, se correlaciona con un aumento de la enzima FAS.



El mismo paradigma existe en la respuesta del LXR- $\alpha$  y el PPAR- $\alpha$  a los AGNEs endógenos producidos por la DRS. Sin embargo, otros factores son alterados por la DRS que podrían incrementar la expresión del LXR- $\alpha$ . Por ejemplo, Mitro y col. (2007) han encontrado que la glucosa y la D-glucosa-6-fosfato son agonistas directos del LXR- $\alpha$  hepático con eficacia similar a los oxiesteroles.

El incremento del LXR- $\alpha$  y la disminución del PPAR- $\alpha$  en los animales alimentados con DRS, podrían atribuirse a que ambos receptores nucleares compiten por la heterodimerización con el RXR (Ijpenberg y col., 1997) (Ide y col., 2003). Más aún, ellos pueden formar heterodímeros con el LXR- $\alpha$  y PPAR- $\alpha$  pudiendo llegar a unirse a secuencias específicas de genes y regularlos, modificando la actividad de enzimas (Miyada y col., 1996) (Yoshikawa y col., 2003) (Brenner, 2008). Joseph y col. (2002) demostraron que la activación *in vivo* del LXR- $\alpha$  indujo la expresión de genes de la FAS, directa o indirectamente, a través de la vía SREBP-1c, lo que se asemeja al efecto lipogénico observado en el presente estudio

Por otro lado, la DRS disminuyó la expresión hepática de SCD-1, tanto el ARNm como su actividad. Esta enzima es limitante en la desaturación en el hígado de los ácidos grasos palmíticos y esteárico a palmitoleico y oleico, respectivamente. Por lo tanto, modula la relación 18:1/18:0 en las células y especialmente la fluidez de las membranas.

Dorbzyn y Ntambi (2005) sugirieron que muchos factores capaces de elevar los niveles de triglicéridos y provocar la lipogénesis, lo hacen regulando positivamente la actividad de la SCD-1 y la biosíntesis de ácido oleico, y que este efecto no es producido por el ácido oleico dietario. Legrand y col. (1997) han mostrado que una inhibición de la actividad  $\Delta 9$  desaturasa en cultivos de hepatocitos de pollo, deteriora la secreción de triglicéridos. Al respecto, Miyazaki y col. (2001) propusieron que una dieta lipogénica rica en sacarosa (55%) requiere un incremento en la biosíntesis de ácido oleico, por medio de la enzima SCD-1, para inducir la síntesis e incremento de triglicéridos. Sin embargo, a pesar de esto, nuestros resultados actuales y previos (Montanaro y col., 2005) muestran que la DRS induce un incremento en los triglicéridos plasmáticos, hipertrigliceridemia y esteatorrea hepática que se correlacionó con una disminución en la actividad de la SCD-1 y en la biosíntesis endógena de ácido oleico. Por lo tanto, en las presentes condiciones experimentales, la hipertrigliceridemia se produce por un mecanismo independiente a la activación de la SCD-1 y difiere con lo encontrado por Dorbzyn y Ntambi (2005). Esta importante discrepancia requerirá un estudio más exhaustivo considerando la interacción



de las dietas, hormonas, receptores nucleares, genes y reacciones enzimáticas involucradas en metabolismo lipídico y que deberán analizarse profundamente.

En general mientras que la DRS disminuye la biosíntesis de los AG monoenoicos, incrementa la de los PUFAs por medio de una “up regulación” de las  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas. Todos los PUFAs n-6 de 20 y 22 carbonos (especialmente 20:4 y 22:5 n-6) se vieron incrementados en los lípidos de membranas de hígado total y microsomal, y este aumento se trasladó en primer lugar en las especies moleculares de fosfatidilcolina 16:0/20:4 n-6 y 18:0/20:4 n-6 que incorporaron selectivamente el ácido araquidónico.

Las  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas son “up reguladas” por la interacción del SREBP-1, PPAR- $\alpha$  y LXR- $\alpha$  en presencia o ausencia de insulina (Montanaro y col., 2007) (Brenner, 2008). La existencia de una interacción entre receptores nucleares resulta necesaria a fin de explicar el efecto que tuvo la DRS sobre las desaturasas ya que el PPAR- $\alpha$  disminuyó y el LXR- $\alpha$  incrementó, siendo ambos activadores de las enzimas de desaturación. Como lo mencionamos anteriormente, la competencia por la heterodimerización con el RXR produciría efectos compensatorios que explicarían lo ocurrido.

**Efecto del aceite de pescado (AHB):** El presente trabajo corrobora la reducción de la dislipidemia y la insensibilidad insulínica en los animales alimentados con DRS cuando la fuente grasa AM es reemplazada por AHB (Lombardo y Chicco, 2006) (Lombardo y col., 2007). Los efectos de reversión de la hipertrigliceridemia y el alto contenido de lípidos intra-hepáticos, estarían relacionados con la normalización de las elevadas actividades de las enzimas lipogénicas y con la activación de la enzima CPT 1, que representa la enzima limitante de la oxidación mitocondrial de AG. Además el aceite de pescado activó la oxidación peroxisomal (aumento de FAO) mediante un incremento en la actividad de PPAR- $\alpha$ . Rakhshandehroo y col. (2007) han demostrado la activación de FAO por el aceite de pescado a través de la activación del PPAR- $\alpha$  en un modelo con ratones PPAR- $\alpha$  “knock out”. Al igual que los hallazgos de otros autores (Neschen y col. 2002) el incremento de la actividad del PPAR- $\alpha$  por los n-3 PUFAs observado en el presente trabajo, podría ser la causa de la activación de CPT 1 y FAO.

Por otro lado, la enzima FAS resulta “down regulada” por el aceite de pescado a través de un mecanismo independiente del PPAR- $\alpha$  (Rakhshandehroo y col. 2007). La administración de aceite de pescado disminuye la forma madura del SREBP-1c “down regulando” el ARNm de este factor de transcripción (Kim y col., 1999) y disminuye la



expresión de FAS y SCD-1 dependiente de elementos regulados por esteroides (SER). El aporte del AHB disminuyó la masa del LXR- $\alpha$ . Ou y col. (2001) demostraron que la disminución del ARNm de SREBP-1c dependiente de AG insaturados, se produce debido a que estos ácidos grasos bloquean en forma competitiva la activación del LXR que a su vez activaría *per se* la expresión del SREBP-1c. En el presente trabajo hemos demostrado que la adición de aceite de pescado a la dieta en los animales alimentados con DRS, disminuye la masa proteica del LXR- $\alpha$  y que esta disminución podría producir el descenso en la actividad de FAS a través de la vía del SREBP-1c. En relación a esto, Montanaro y col. (2007) han demostrado previamente que el T090137, un agonista xenobiótico del LXR, estimula la expresión del sreb-1 y mejora los niveles de nSREBP-1 independientemente o ligado a un mecanismo dependiente de insulina.

Los n-3 PUFAs del aceite de pescado no tuvieron efectos relevantes en la expresión y actividad de las desaturasas, aún la disminución de la expresión (ARNm) de la SCD-1 no modificó la proporción de ácido oleico ni la relación 18:1/18:0 n-6 en los lípidos hepáticos. Por lo tanto la marcada disminución de todos los n-6 PUFAs de los lípidos hepáticos en ratas alimentadas con DRS+AHB, aparentemente sería una consecuencia del bajo porcentaje de ácido linoleico en la dieta y por lo tanto de la menor conversión a los otros PUFAs. Esta conclusión concuerda con los resultados de Christiansen y col. (1991), que midieron las actividades de las desaturasas hepáticas luego de alimentar a ratas durante 3 semanas con dietas conteniendo 21% de aceite de lino más 79% de aceite de girasol o aceite de pescado (PUFAs n-3). Ellos encontraron que el aceite de lino (rico en 18:3 n-3) o el aceite de lino más el aceite de girasol (rico en 18:2 n-6) estimulaba las  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas e inhibía la  $\Delta 9$  desaturasa, mientras que el aceite de pescado comparado a la dieta control disminuía solamente la  $\Delta 9$  desaturasa. Los efectos del aceite de pescado en este estudio no se vieron relacionados con el PPAR- $\alpha$ , LXR- $\alpha$  o SREBP-1c sobre la  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas.

La administración de aceite de pescado, produjo un incremento importante de los ácidos grasos 20:5 y 22:6 n-3 que se trasladó a las especies moleculares y por lo tanto podrían afectar las propiedades y funciones de las membranas (Wassall y Stillwell, 2008).



### PARTE 3. METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y VIAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN HÍGADO DE RATAS DISLIPÉMICAS INSULINO RESISTENTES. EFECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS N-3 PUFAs DIETARIOS.

Como mencionáramos en el capítulo “Introducción”, ratas normales Wistar alimentadas crónicamente con DRS presentan anormal homeostasis de la glucosa e insensibilidad insulínica acompañada de hipertrigliceridemia. Los niveles de AGNE en estos animales se encuentran muy elevados. Esto resulta de particular interés, puesto que el incremento en la disponibilidad de AGNE en músculo e hígado se encuentra asociado con una reducción en la acción insulínica sobre la utilización y reserva de la glucosa (insulino resistencia). Numerosos estudios han observado que la reducción de la disponibilidad de AGNE mejoraría la sensibilidad insulínica. En particular, en el modelo con DRS, el efecto hipolipemiante del AHB dietario normalizó la sensibilidad insulínica periférica global (Lombardo y col., 2007). Sin embargo existen datos contradictorios en la literatura sobre la acción de los n-3 PUFAs sobre el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad insulínica a nivel hepático.

Por lo anteriormente expuesto, nos propusimos estudiar algunos mecanismos involucrados en la anormal homeostasis de la glucosa e insulino resistencia en este modelo experimental. Al respecto analizamos: a) las vías glicolítica, oxidativa y no oxidativa de la glucosa, b) intermediarios importantes en la cadena de señales de la insulina (IRS-1, subunidad  $\alpha$ 85 PI3K) y c) el efecto de la administración de AHB como fuente dietaria sobre los parámetros antes mencionados.

En este contexto y para alcanzar los objetivos propuestos se determinaron, en ratas alimentadas crónicamente con DRS (8 meses) y en los animales a los que se les sustituyó la fuente grasa (AM por AHB+AM) en los 2 últimos meses de experimentación, los siguientes parámetros: 1) actividades de enzimas involucradas en la vía no-oxidativa, glicolítica y oxidativa del metabolismo de la glucosa (glucoquinasa, hexoquinasa, glucógeno sintasa, glucosa-6-fosfato-fosfatasa, piruvato quinasa, complejo piruvato dehidrogenasa, y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa), 2) concentración de metabolitos hepáticos relacionados con las vías metabólicas mencionadas en el ítem 1 (glucógeno, glucosa-6-fosfato, fructosa-1-fosfato y fructosa-2,6-bifosfato), 3) cascada de señales de insulina: sustrato receptor de insulina 1 (IRS-1) y subunidad  $\alpha$ 85 de la fosfatidilinositol-3-quinasa ( $\alpha$ 85 PI3K). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:



### 3.1. Efecto de la DRS sobre la fosforilación de la glucosa. Acción del AHB.

En la **Tabla 9** se muestran las actividades de las enzimas glucoquinasa (GK) y hexoquinasa (HK) en el tejido hepático. Como se puede observar, la DRS presentó una actividad GK significativamente disminuida ( $p < 0,05$ ) respecto al lote control. La incorporación de AHB a la dieta, no logró revertir la actividad disminuida de la enzima GK. Los valores obtenidos fueron similares a los observados en los animales dislipémicos. Por otro lado, no se observaron modificaciones en la actividad HK en los tres grupos dietarios.

**Tabla 9.** Actividades enzimáticas glucoquinasa (GK) y hexoquinasa (HK) en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS ó DRS+AHB al final del período experimental.

	DC	DRS	DRS+AHB
GK (mU/mg proteína)	7,24 ± 0,42 <sup>a</sup>	5,14 ± 0,38 <sup>b</sup>	5,15 ± 0,41 <sup>b</sup>
HK (mU/mg proteína)	2,09 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,82 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,97 ± 0,07 <sup>a</sup>

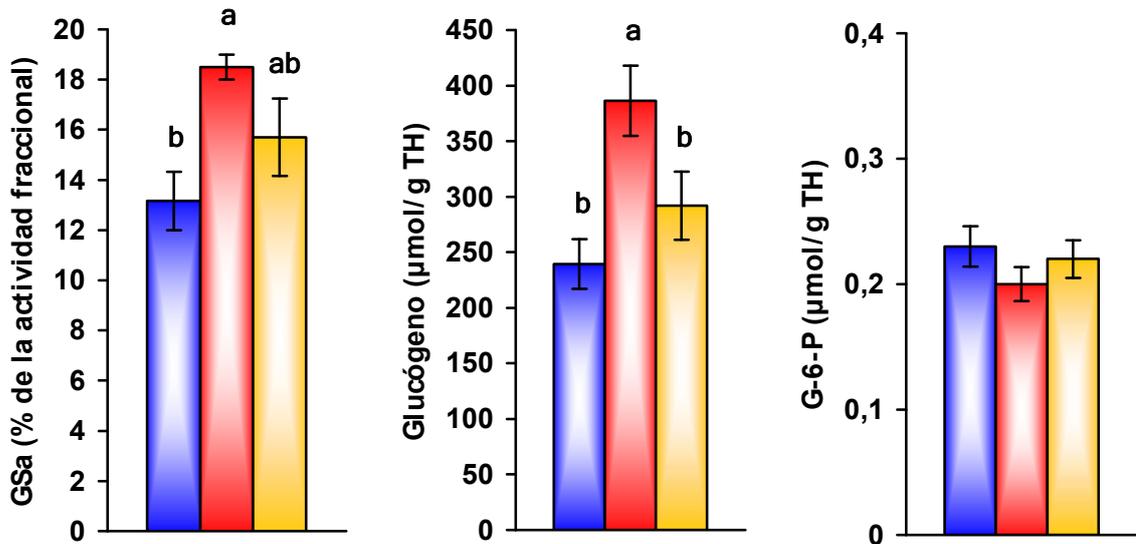
Los valores se expresan como media ± SEM (n = 6). Los valores en cada fila que no comparten la misma letra supraescrita son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.



**3.2. Efecto de la DRS sobre la vía no oxidativa de la glucosa. Acción del AHB.**

La **Figura 13** muestra la actividad de la enzima glucógeno sintasa (GS), el contenido de glucógeno hepático y la concentración de glucosa-6-fosfato (G-6-P). Los hígados de ratas alimentadas con DRS presentaron un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de la actividad GS (expresada como % de la actividad fraccional) respecto a los animales con DC. Esto se asoció a un mayor contenido de glucógeno hepático con diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al lote control, sin modificación en el contenido de G-6-P. El AHB dietario disminuyó la actividad GS alcanzando niveles intermedios respecto de los animales con DRS y DC. El contenido de glucógeno hepático se mantuvo en niveles ligeramente más elevados (no significativos) respecto al lote control. El contenido de G-6-P fue similar en los tres grupos dietarios.

**Figura 13.** Actividad GS y contenido de glucógeno y G-6-P en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS ó DRS+AHB al final del período experimental.



GSa es el % de la actividad enzimática fraccional ( $\% \text{ GSa} / \text{GSa} + \text{b}$ ). Mayores detalles en Materiales y Métodos. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

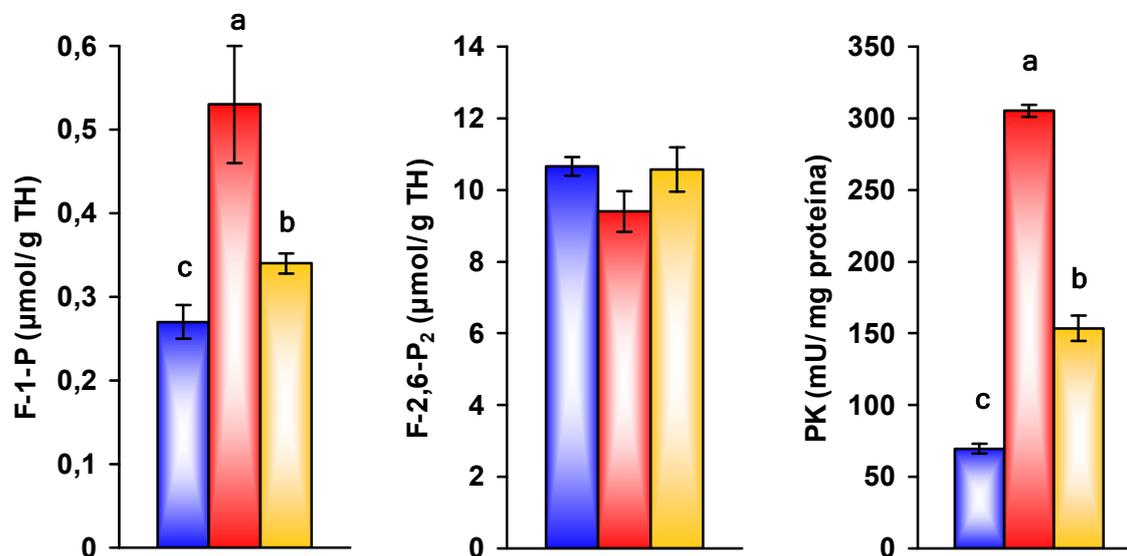
■ DC      ■ DRS      ■ DRS+AHB



### 3.3. Intermediarios de la vía glicolítica y actividad de la enzima piruvato quinasa (PK): efecto de la administración de DRS. Acción del AHB.

La **Figura 14** muestra la concentración de fructosa-1-fosfato (F-1-P) y fructosa-2,6-bifosfato (F-2,6-P<sub>2</sub>) y la actividad de la enzima PK en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB. La DRS produjo un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de F-1-P respecto al lote alimentado con DC, mientras que la concentración de F-2,6-P<sub>2</sub> permaneció invariable. La actividad PK también se vio incrementada en los animales dislipidémicos. La adición de AHB en la DRS produjo una disminución ( $p < 0,05$ ) en la concentración de F-1-P, permaneciendo aún significativamente más elevada ( $p < 0,05$ ) que en el hígado de los animales alimentados con DC. El aporte de AHB en la dieta no produjo cambios en la concentración de F-2,6-P<sub>2</sub>. Por otro lado la actividad PK también se vio disminuida por la administración del aceite de pescado, sin alcanzar los valores observados en los animales con DC.

**Figura 14.** Concentración F-1-P y F-2,6-P<sub>2</sub> y actividad PK en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS ó DRS+AHB al final del período experimental.



Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

■ DC      ■ DRS      ■ DRS+AHB



### 3.4. Efecto de la DRS sobre la actividad del complejo enzimático de la piruvato dehidrogenasa (PDHc) -estimación de la vía oxidativa de la glucosa - Acción del AHB.

La **Tabla 10** muestra la actividad del complejo PDHc (como PDHa -forma activa- % del total). Los animales alimentados con DRS exhibieron actividades significativamente incrementadas ( $p < 0,05$ ) respecto de los animales alimentados con DC. La administración de AHB dietario normalizó los niveles de la actividad del complejo. No se observaron modificaciones en la actividad PDH total del complejo en los tres grupos dietarios, expresado como mU/mg proteína o por unidades de citrato sintasa (datos no mostrados).

**Tabla 10.** Actividad enzimática del complejo PDH (PDHc) en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS ó DRS+AHB al final del período experimental.

	DC	DRS	DRS+AHB
PDHa *	35,02 ± 1,61 <sup>b</sup>	50,55 ± 3,04 <sup>a</sup>	36,33 ± 1,54 <sup>b</sup>

\* PDHa (% PDH total). Los valores se expresan como media ± SEM (n = 6). Los valores en cada fila que no comparten la misma letra supraescrita son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

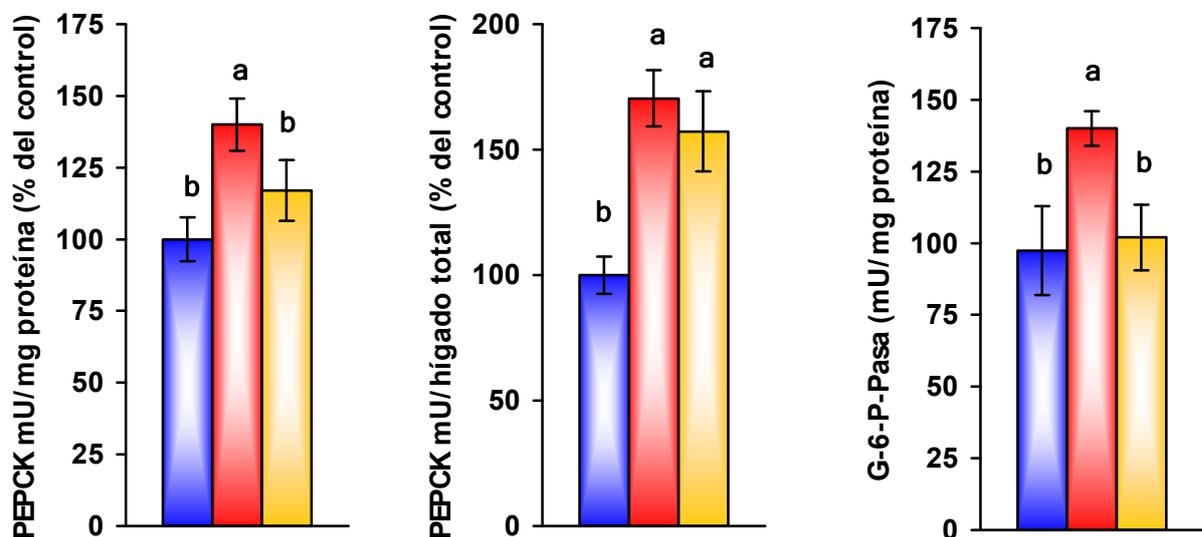
### 3.5. Efecto de la DRS sobre enzimas de la gluconeogénesis. Acción del AHB.

En la **Figura 15** se observan las actividades de dos enzimas implicadas en la gluconeogénesis: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y glucosa-6-fosfato-fosfatasa (G-6-P-Pasa) en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS ó DRS+AHB. La otra enzima clave que interviene en esta vía es la fructosa-1,6-bifosfatasa. Su regulador directo es la F-2,6-P<sub>2</sub>, cuyos valores fueron presentados en el ítem 3.3. La DRS incrementó la actividad de la enzima PEPCK con respecto al lote control expresado tanto como mU/mg proteína o



como en mU/órgano total. La administración de AHB dietario, normalizó la actividad PEPCK cuando se expresa como mU/mg proteína. La DRS incrementó la actividad G-6-P-Pasa y el AHB dietario la normalizó alcanzando valores semejantes al lote DC.

**Figura 15.** Actividades PEPCK y G-6-P-Pasa en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS ó DRS+AHB al final del período experimental.



Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6). Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

■ DC     
 ■ DRS     
 ■ DRS+AHB

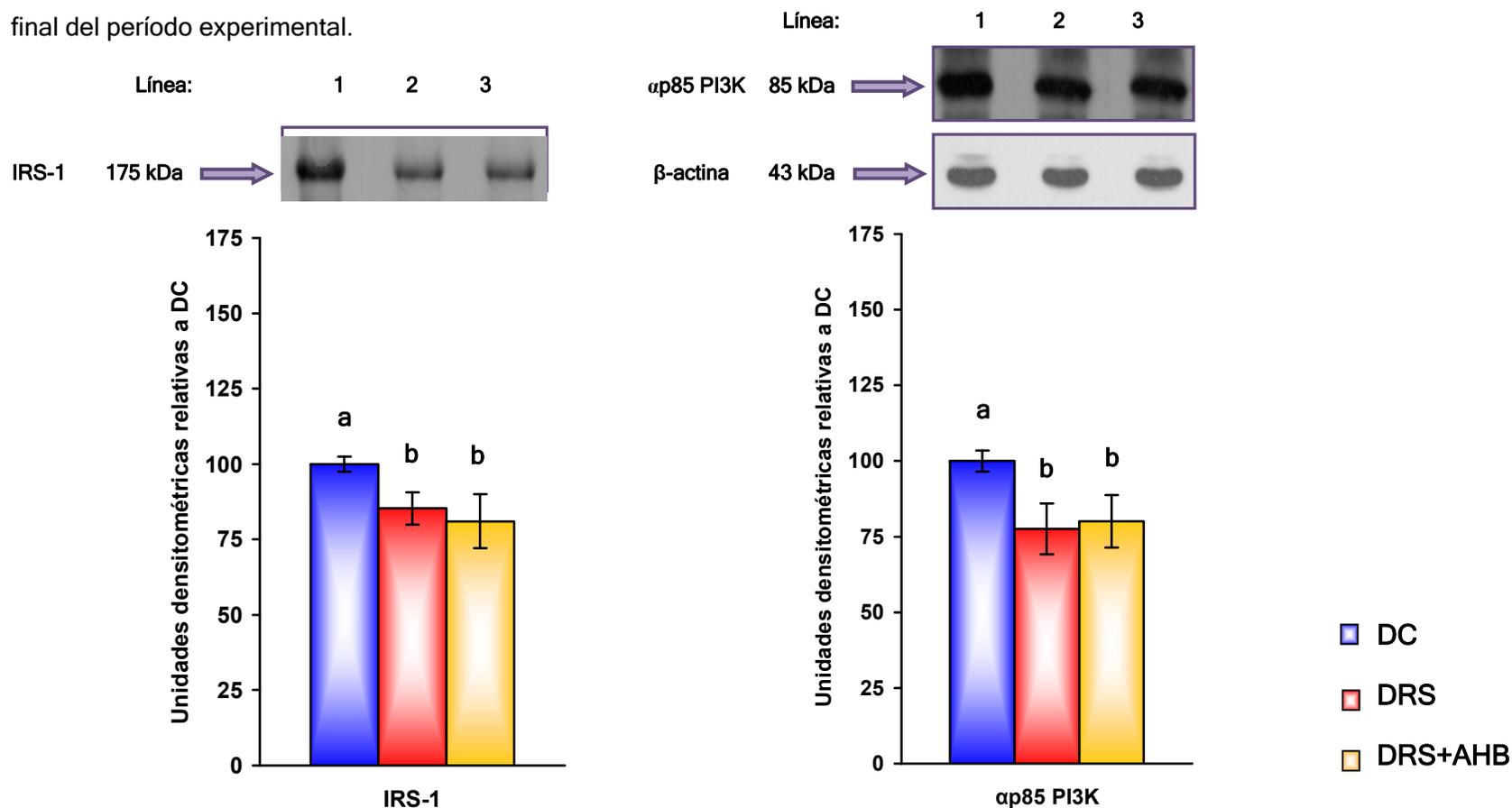


**3.6. Efecto de la DRS sobre la expresión de la masa proteica del sustrato receptor de insulina 1 (IRS-1) y subunidad  $\alpha$ 85 de la fosfatidilinositol-3-quinasa ( $\alpha$ 85 PI3K) hepática. Acción del AHB.**

La **Figura 16** muestra la masa proteica del sustrato receptor de insulina 1 (IRS-1) y de la subunidad  $\alpha$ 85 de la fosfatidilinositol-3-quinasa ( $\alpha$ 85 PI3K) en tejido hepático en los tres grupos dietarios. Las determinaciones se realizaron en condiciones basales, sin administración exógena de insulina con el fin de evaluar los efectos de la DRS y del AHB en las condiciones fisiológicas. Se observa que la DRS produjo una disminución ( $p < 0,05$ ) en la masa del IRS-1 y de la  $\alpha$ 85 PI3K, respecto del grupo control. Al sustituir la fuente grasa en los animales alimentados con DRS (DRS+AHB), la masa de IRS-1 y de  $\alpha$ 85 PI3K mostró valores similares al grupo DRS.



**Figura 16.** Expresión de la masa proteica del IRS-1 y  $\alpha$ P85 PI3K en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB al final del período experimental.



*Panel superior:* Inmunoblots de IRS-1,  $\alpha$ p85 PI3K hepático y  $\beta$ -actina de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB. El marcador molecular del IRS-1 y  $\alpha$ p85 PI3K se indica a la izquierda; Línea 1: DC; Línea 2: DRS; Línea 3: DRS+AHB. *Panel inferior:* Análisis densitométrico de la masa proteica del IRS-1 y  $\alpha$ p85 PI3K en tejido hepático. Los valores de masa proteica del  $\alpha$ p85 PI3K fueron corregidos por los niveles de  $\beta$ -actina presentes en cada una de las muestras. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (n = 6) relativos a DC. Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes (p<0,05) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.



## DISCUSIÓN

La composición de macronutrientes de la dieta puede influenciar la regulación de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa en el hígado y otros tejidos claves a la acción de la hormona (Storlien y col., 1986) (Pagliassotti y col., 1994).

Con la cronicidad de la dieta, los animales dislipémicos alimentados con DRS presentan hiperglucemia con normoinsulinemia que se ve acompañado de alteraciones en el metabolismo de la glucosa en diferentes tejidos como el músculo esquelético y corazón (Lombardo y Chicco, 2006). El hígado de estos animales no resulta ajeno a las modificaciones metabólicas inducidas por esta dieta, sin embargo las alteraciones en el metabolismo de la glucosa muestran diferencias respecto a otros órganos debido a las características y funciones que le son propias.

Los resultados obtenidos indican que la administración crónica (8 meses) de una DRS a ratas machos Wistar, induce en el hígado: 1) reducción en la fosforilación de la glucosa, asociada a una menor actividad GK, 2) aumento de la vía no oxidativa de la glucosa, dada una mayor actividad de la enzima GS y consecuentemente un incremento en el contenido de glucógeno hepático sin modificaciones de los niveles de G-6-P, 3) aumento de la vía glicolítica, atribuido a una mayor actividad PK sin modificaciones en los niveles de F-2,6-P<sub>2</sub>. Esto se acompaña de un incremento en la actividad del complejo PDH (PDHa) indicando una mayor oxidación de la glucosa, 4) vía gluconeogénica alterada (mayor actividad G-6-P-Pasa y PEPCK), y 5) menor expresión de la masa proteica del IRS-1 y la subunidad  $\alpha$ 85 de la enzima PI3K. Esto último sugiere una alteración en la vía de señalización de la insulina. La sustitución de la fuente de grasa dietaria (AM por AHB) durante los dos 2 últimos meses, en los animales alimentados crónicamente con DRS, normalizó el contenido de glucógeno y las actividades enzimáticas PEPCK, G-6-P-Pasa y la forma activa (PDHa) del complejo piruvato dehidrogenasa. El AHB fue capaz de mejorar las actividades GS y PK. Sin embargo no se observaron modificaciones en la actividad GK y en la masa proteica del IRS-1 y  $\alpha$ 85 PI3K, cuyos valores permanecieron similares al lote DRS.

Las dietas ricas en grasas (Kraegen y col., 1991) como también las dietas ricas en sacarosa (Pagliassotti y col., 1996) (Tobey y col., 1982), inducen insulino resistencia hepática (la insulina no es capaz de inhibir la producción hepática de glucosa) con anterioridad a una manifiesta insulino resistencia de los tejidos periféricos. Al respecto,



Kergoat y col. (1987) demostraron en ratas Wistar alimentadas con DRS durante un período corto de tiempo (4 semanas), una disminución de la acción insulínica en la producción hepática de glucosa sugiriendo que este tejido se vuelve resistente a la acción de la insulina luego del aporte de sacarosa en la dieta. Otros investigadores comprobaron estos hallazgos administrando la DRS durante 1 semana, sin embargo la captación de glucosa en el músculo esquelético y tejido adiposo disminuyó luego 2 a 5 semanas de ingesta, demostrando que la insulino resistencia se desarrollaría inicialmente en los tejidos gluconeogénicos y luego continuaría el deterioro en otros tejidos periféricos sensibles a la hormona (Bizeau y col., 2005).

En este trabajo pudimos comprobar que la ingesta crónica con DRS durante 8 meses, produjo en el hígado una disminución en la actividad GK (sin modificación en la actividad HK) y un incremento en la actividad de la enzima G-6-P-Pasa. Esto se refleja directamente en una disminución en la relación GK/G-6-P-Pasa (DC:  $0,063 \pm 0,004$ ; DRS:  $0,024 \pm 0,003$ ;  $p < 0,05$ ), sugiriendo en parte la mayor salida hepática de glucosa a la circulación. Pagliassotti y col. (2003), demostraron que mediante la re-alimentación a ratas Wistar con DRS durante 3 horas, luego de un ayuno prolongado (48 horas), incrementó la expresión génica y la actividad G-6-P-Pasa. Además, Bizeau y col. (2001) observaron un incremento en la actividad hepática G-6-P-Pasa y disminución de la actividad GK en ratas alimentadas durante 1 semana con DRS. Más aún, Wei y col. (2004) demostraron que un incremento en la concentración de fructosa en vena porta, con concentraciones similares a las registradas luego de una ingesta con dietas ricas en sacarosa o fructosa, aumenta la expresión G-6-P-Pasa.

Al presente se conoce que la F-1-P compite con la F-6-P por la unión con una proteína reguladora de GK (GKRP) y de acuerdo a los estudios de Davies y col. (1990) en hepatocitos aislados, cuando los niveles de F-1-P alcanzan niveles de  $0,10-0,22 \mu\text{moles/g}$  hígado, esto favorece la translocación de la GK hacia el citosol facilitando el acceso a su sustrato. Por otro lado, Gannon y col. (1986) en un estudio en pacientes con diabetes tipo 2 no tratados, encontraron un pequeño efecto por parte de la fructosa en disminuir la respuesta a la glucosa plasmática, cuando se ingería como una mezcla de glucosa y fructosa ó sacarosa, a pesar de la estimulación de la secreción insulínica. Por lo que el efecto catalítico de la fructosa, sobre la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno, podría jugar un rol menor en el metabolismo postprandial de los carbohidratos en el tejido hepático (Bizeau y Pagliassotti, 2005). La GK resulta positivamente regulada por la acción



de la insulina y diferentes investigadores han demostrado que en el hígado de animales alimentados con DRS o fructosa ocurre un deterioro progresivo en la regulación de la salida hepática de glucosa -inducido por la insulina- que incluye efectos directos sobre la acción insulínica en este tejido e involucra intermediarios a nivel post-receptor de la cascada de señales de insulina tales como: IRS-1, IRS-2, PI3K, entre otros (Pagliassotti y col., 2002). Disminuyendo la expresión del IRS-1 mediante el empleo de adenovirus, Taniguchi y col. (2005) demostraron en hígado de ratones, que una interferencia en la expresión del IRS-1 provoca un incremento en la gluconeogénesis y una disminución en la expresión de la GK.

Al respecto nuestros resultados demuestran, en ratas alimentadas en forma crónica (8 meses) con una DRS, una alteración en la cascada de señalización de la insulina (disminución en la masa proteica del IRS-1 y subunidad  $\alpha$ p85 PI3K) en condiciones basales. Estos resultados son muy interesantes ya que trabajos de Bezerra y col. (2000) y Pagliassotti y col. (2002), encontraron solamente una disminución en la masa proteica del IRS-1 solo en presencia del estímulo de la insulina en hígado de ratas alimentadas con DRS durante un corto periodo de tiempo (3 semanas), sin observar ningún cambio significativo a nivel basal. A pesar de la reducción hepática en la señal insulínica, Pagliassotti y col. (2002) observaron un incremento en la actividad de la PI3K respecto al control. Además, Wei y Pagliassotti (2004) demostraron en hígado de ratas alimentadas con DRS durante 1 semana, un incremento en la actividad de la quinasa NH<sub>2</sub>-terminal c-jun (JNK) y en la fosforilación de la serina 307 del IRS-1. En base a lo expuesto, los resultados obtenidos sugieren que el mayor tiempo de administración de la DRS sería un factor importante y clave en el deterioro paulatino de la cascada de señalización de la insulina que comenzaría a manifestarse bajo el estímulo de la hormona, cuando la dieta se administra por períodos cortos de tiempo, alcanzando una evidente alteración a nivel basal con la cronicidad de la misma.

En los animales alimentados con DRS observamos un incremento en las actividades de las enzimas hepáticas implicadas en las vías glicolítica y gluconeogénica: PK y PEPCK. Al respecto, Pagliassotti y col. (1994) demostraron un aumento del 50% en la actividad PEPCK en hígado de ratas alimentadas durante 2 semanas con sacarosa (respecto a ratas con DC) a pesar de la hiperinsulinemia presente en este periodo de tiempo de dieta, asociándolo a la insulino-resistencia presente en los animales con DRS. En el presente trabajo, el aumento de la actividad PEPCK, podría deberse a una reducción



en la capacidad de la insulina en inhibir esta enzima. A pesar del incremento en la actividad PEPCK en los animales alimentados con DRS, la relación PK/PEPCK se vio incrementada (DC:  $30 \pm 3$ ; DRS:  $95 \pm 4$ ;  $p < 0,05$ ), lo que se asocia principalmente a un aumento en la actividad PK y consecuentemente en una inducción de la vía glicolítica.

Vrána y Fábry (1983), al analizar los efectos de la fructosa en diferentes tejidos, observaron la capacidad que posee este hidrato de carbono para incrementar la actividad PK en hígado. Por su parte, Liimatta y col. (1994) señalaron que el grado de expresión de la enzima PK puede incrementarse por acción de la insulina y los carbohidratos. Actualmente se sabe que el control de la expresión de esta enzima se halla altamente regulado por el factor de transcripción ChREBP (Yamashita y col., 2001) y se cree que los altos niveles de xilulosa-5-fosfato (X-5-P) podrían promover la activación de ChREBP (Dentin y col., 2006). Si bien en la presente tesis no analizamos el contenido de X-5-P hepático, el incremento observado de la actividad G-6-PDH en los animales con DRS sugeriría un incremento en la vía de las pentosas. Otros autores también observaron un incremento en esta vía estimulada por la ingesta con una dieta rica en sacarosa (Cohen y col., 1972) (Sassoon y col., 1973) (Mack y col., 1975).

La GS está contralada por diversas fosforilaciones en múltiples sitios y alostéricamente por su unión a ligandos (Roach PJ, 1986) (Lawrence y Roach, 1997). El estado fosforilado conduce a su inactivación. Además, la insulina es capaz de inducir su actividad principalmente vía la cascada de señales que involucra la PI3K. La activación de la PI3K por la insulina, promueve la fosforilación y activación de la proteína quinasa B la cual fosforila e inactiva la glúcogeno sintasa quinasa-3 (GSK-3). La desfosforilación de la GS por acción de la insulina, causa cambios significativos en la cinética enzimática que resulta generalmente en un incremento de la actividad (Skurat y col., 2000). Al respecto, en los animales con DRS encontramos un aumento en el contenido de glucógeno hepático asociado con una mayor actividad GS en este tejido. Como mencionáramos anteriormente, un significativo incremento del contenido hepático de F-1-P fue observado en el grupo con DRS. Esto concuerda con diferentes estudios donde se demostró una estrecha relación entre la actividad GS y los niveles de F-1-P. Gergely y col. (1985) estudiaron en hígado de ratas mediante la administración de fructosa, los efectos de la concentración de F-1-P sobre la regulación de la GS. Ellos encontraron que la F-1-P condujo a un incremento en la síntesis de glucógeno hepático, activando la glúcogeno



sintasa hepática inactiva (GSb) y promoviendo la conversión de la glucógeno sintasa b inactiva (GSb) a su forma activa (GSa). De acuerdo a este estudio, la F-1-P incrementa la afinidad de la GSb por su sustrato (UDP-glucosa). Por otro lado, Youn y col. (1987) demostraron que la fructosa a través de la F-1-P, promueve la síntesis de glucógeno en el hígado suprimiendo la glucogenólisis por una inhibición alostérica de la fosforilasa que interviene en la hidrólisis del glucógeno. Por lo tanto, los niveles elevados de F-1-P en el hígado de ratas dislipidémicas estarían asociados con una estimulación de la glucogenogénesis mediante la activación de la GS.

La actividad enzimática del complejo PDH hepática se incrementó significativamente en los animales alimentados con DRS. Varios estudios con animales alimentados durante 1-3 semanas con sacarosa o fructosa mostraron un incremento en la actividad PDHa hepática (Vrána y col., 1983) (Da Silva y col., 1993). Estudios in vitro demuestran que la insulina incrementa rápidamente el porcentaje de la forma activa del complejo PDH en el tejido adiposo de ratas, sin embargo en el hígado la insulina tiene un pequeño efecto sobre la actividad enzimática (Randle, 1986). Park y col. (1992) demostraron una activación de la PDHa en el hígado de ratas alimentadas durante 3-5 semanas con 70% de fructosa. Al respecto, observaron que la fructosa indujo un incremento del 44% en la PDHa hepática asociada a una disminución del 66% en la actividad de la PDH quinasa lo que explicaría la activación del complejo. La activación del complejo promueve la síntesis de acetil-CoA, favoreciendo la biosíntesis de novo de ácidos grasos. Además la fructosa, comparada con la glucosa, es un potente inductor del SREBP-1c que promueve la expresión y activación de enzimas lipogénicas para finalmente estimular la producción de Tg hepáticos (Miyazaki y col., 2004). Si la ingesta es excesiva, el potencial que tendrá la fructosa para estimular la lipogénesis estará sustancialmente incrementado (Bantle, 2009). Por lo tanto en nuestro modelo con DRS, la fructosa aportada a través de la dieta activa las enzimas PK y PDHc, favoreciendo la biosíntesis de novo de ácidos grasos.

Al respecto, los animales dislipémicos exhibieron: un significativo incremento en las actividades de las enzimas lipogénicas (FAS, EM, G-6-PDH) y una menor actividad de la enzima CPT-1 (menor oxidación de ácidos grasos), asociado a un incremento en la expresión del LXR- $\alpha$  y acompañada de una menor expresión del PPAR- $\alpha$ . Los resultados



sugieren un destino preferencial de los ácidos grasos hacia las vías de reserva y secretorio en desmedro de su oxidación.

En presencia de un incremento de AGNEs plasmáticos, Reaven (1988) señaló que una mayor utilización hepática de AGNEs sería un mecanismo fisiopatológico central responsable del desarrollo de la hiperglucemia en humanos, ya que la movilización de grandes cantidades de AGNEs al hígado tiene como consecuencia el desarrollo de hiperinsulinemia por alteración del catabolismo de la insulina, hiperglicemia por aumento de la gluconeogénesis e hipertrigliceridemia. Más aún, una modulación aguda del metabolismo de AGNEs “in vivo” en humanos y en modelos experimentales de diabetes tipo 2 (ejemplo: ratas con RI por DRS o fructosa), ya sea directa por inhibición de la lipólisis o indirectamente por inhibición de la oxidación de AGNEs, o ambos, reducen los niveles de glucosa sin cambios notables en la insulinemia. Estudios “in vitro” e “in vivo” señalan que elevados niveles de AGNEs plasmáticos incrementan la gluconeogénesis (Boden, 1996) y la glucogenólisis (Staehr y col., 2003). Esto causaría una moderada hiperglucemia y además podrían iniciar procesos inflamatorios en el hígado dando como resultado el desarrollo de una esteatohepatitis (Boden y col., 2005).

Al respecto el aumento de ácidos grasos registrado en el hígado de ratas dislipémicas, contribuiría con el desarrollo de la insulino-resistencia hepática. Esto favorecería la mayor salida hepática de glucosa (asociada a la activación de la enzima G-6-P-Pasa) y junto a la menor captación por parte de los tejidos periféricos, conduciría a la hiperglucemia moderada en éstos animales.

**Efecto de la administración de AHB:** En la Parte 2 de la presente tesis pudimos constatar algunos mecanismos implicados en el efecto hipolipemiante de los n-3 PUFAs dietarios. Sin embargo, un comportamiento en algunos aspectos diferentes observamos cuando analizamos las alteraciones del metabolismo glucídico a nivel hepático en las mismas condiciones experimentales. Esto se demuestra al observar la discrepancia en la respuesta al cambio de este nutriente en relación a las enzimas involucradas en las vías de utilización, síntesis de glucosa y señalización de la insulina.

Al sustituir la fuente grasa dietaria, observamos una disminución significativa en la actividad PK y normalización del complejo PDH. Al respecto, Dentin y col. (2005)



demonstraron que los PUFAs son potentes inhibidores de la PK y de la FAS, a través del factor de transcripción ChREBP. En un modelo murino, tanto in vivo como in vitro, demostraron que los PUFAs inhiben la activación de ChREBP alterando la estabilidad del ARNm de ChREBP y su translocación hacia el núcleo. Además, Liimatta y col. (1994) demostraron que los PUFAs suprimen tanto la actividad como la expresión (ARNm) de la PK, tanto in vivo como in vitro. Ellos sugieren que los PUFAs inhiben la transcripción del gen PK interfiriendo con la activación por el factor nuclear de hepatocitos-4 (HNF-4).

La disminución en la actividad PK observada en el hígado de ratas con DRS+AHB, sugiere un menor flujo de piruvato hacia acetil-CoA asociado a una normalización de la actividad del complejo PDH. Además, la relación PK/PEPCK disminuyó por la administración del AHB dietario sin alcanzar los valores observados en el grupo control (DC) (DC:  $30 \pm 3$ ; DRS:  $95 \pm 4$ ; DRS+AHB:  $57,1 \pm 5$ ), lo que refleja una menor actividad PK en los animales alimentados con AHB. Por otro lado la relación GK/G-6-P-Pasa se vio incrementada en el grupo alimentado con AHB respecto al grupo con DRS, sin alcanzar los niveles normales (DC:  $0,063 \pm 0,004$ ; DRS:  $0,024 \pm 0,003$ ; DRS+AHB:  $0,040 \pm 0,002$ ). Esto es el resultado de una actividad GK similar al lote DRS, con una normalización de la actividad G-6-P-Pasa. El conjunto de ambas relaciones sugieren que el efecto de los n-3 PUFAs mejorarían la salida hepática de glucosa en los animales con DRS sin lograr normalizarlo.

Al respecto, examinando algunos intermediarios claves involucrados en la cascada de señales de la acción insulínica, pudimos ver que la menor expresión de la masa proteica del IRS-1 y de la subunidad  $\alpha p85$  PI3K, observada en los animales con DRS, no se revertieron con la presencia del AHB. Trabajos de Klimes y col. (1993) no observaron cambios en la unión de la insulina a su receptor en hepatocitos aislados de animales alimentados con DRS o DRS+AHB durante 3 semanas. La unión de la insulina como la autofosforilación del receptor medidos en condiciones basales y bajo estímulo de la hormona, utilizando receptores aislados purificados de hepatocitos de ratas alimentadas con DRS o DRS+AHB, no mostraron ninguna diferencia significativa respecto a los animales alimentados con dieta control. Por otro lado, Taouis y col. (2002) en ratas alimentadas durante 4 semanas con dieta grasa rica en n-6 ó n-3 PUFAs, demostraron diferencias en la incorporación de los ácidos grasos PUFAs en los fosfolípidos de membranas de diferentes tejidos (hígado, músculo y adiposo), resultando el músculo el



mas enriquecido en n-3 PUFAs. Además observaron que el aporte de n-3 PUFAs a la dieta grasa respecto al control, mantuvo la expresión del IR e IRS-1 fosforilado, la actividad PI3K y el contenido de Glut 4 en el músculo pero no en el hígado en donde se produjo una disminución en la expresión del IRS-1 fosforilado. Ellos concluyen que a pesar del efecto positivo atribuido a los n-3 PUFAs, la hiperglucemia e hiperinsulinemia aún presentes en los animales alimentados con dieta grasa, indicaría que la insensibilidad insulínica en el hígado contribuiría marcadamente a la resistencia insulínica.

Como mencionamos en el capítulo anterior, los PUFAs normalizan el metabolismo lipídico. Sin embargo, a pesar de la normalización lipídica, la insensibilidad insulínica a nivel hepático no se normalizó en presencia del AHB. Trabajos previos del grupo (D'Alessandro y col., 2000) (Pighin y col., 2003), demostraron que la administración de AHB en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas en la presente tesis, normalizó la sensibilidad insulínica periférica global (clamp euglucémica-hiperinsulinémica) y los niveles de glucemia. La RI periférica global involucra fundamentalmente tejidos tales como: músculo, adiposo, etc. (D'Alessandro y col., 2000) (Lombardo y Chicco, 2006) (Rossi y col., 2009). Uno de los posibles mecanismos por los cuales los n-3 PUFAs mejorarían la acción insulínica en estos tejidos, podría relacionarse con cambios en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas celulares. Este efecto podría modificar la estructura y fluidéz de las membranas celulares, afectando directamente la acción insulínica (ej. receptor de insulina/IRS-1 e IRS-2 y PI3K) (Lombardo y Chicco, 2008).

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran: a) reversión de la resistencia insulínica periférica global, b) mejoramiento de la sensibilidad insulínica a nivel hepático. Estos hallazgos junto a la normalización de la secreción de insulina in vitro en estudios con islotes perifundidos aislados, previamente demostrado (Pighin y col., 2003), conducirían al restablecimiento de la glucemia dentro de los niveles normales en los animales alimentados con DRS+AHB.

**CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

La presente tesis demuestra la importancia del modelo experimental utilizado como herramienta útil para simular patologías asociadas al síndrome plurimetabólico (dislipidemia, resistencia insulínica, diabetes tipo 2, etc.) y poder dilucidar algunos mecanismos, causas y desarrollo de estas alteraciones fisiológicas. Asimismo brinda la posibilidad de utilizar cambios nutricionales que pueden mejorar y/o revertir estas anomalías.

Los resultados alcanzados en el presente trabajo demuestran que la administración crónica de una DRS indujo en el hígado un incremento en la masa proteica del receptor nuclear LXR- $\alpha$  y una disminución en la masa del receptor PPAR- $\alpha$ . Esto se relacionó con la activación de las enzimas lipogénicas y una menor actividad de las enzimas implicadas en la oxidación de ácidos grasos, indicando un destino preferencial de los ácidos grasos hacia la vía de reesterificación y síntesis de triglicéridos hepáticos. Por otro lado, los animales dislipidémicos exhibieron un deterioro en la cascada de señales de la acción insulínica en el tejido hepático asociado a la menor masa proteica del IRS-1 y de la subunidad  $\alpha$ p85 PI3K. Esto explicaría la moderada hiperglucemia presente en estos animales.

La sustitución del AM por AHB produjo un incremento en la actividad de las enzimas de la oxidación de ácidos grasos y una normalización de las enzimas lipogénicas conjuntamente con un aumento en la masa proteica del PPAR- $\alpha$  y una disminución de la masa del LXR- $\alpha$ . Esto indica una menor síntesis de novo de ácidos grasos y un incremento de las vías oxidativas que sumado a una menor disponibilidad hepática de ácidos grasos plasmáticos contribuirían a la reversión de la esteatosis hepática y dislipidemia. Por otro lado, la menor expresión de la masa proteica del IRS-1 y de la subunidad  $\alpha$ p85 PI3K observada en los animales con DRS, no alcanzó a revertirse completamente con la presencia del AHB. La reversión de la resistencia insulínica periférica global y el mejoramiento de la sensibilidad insulínica a nivel hepático, junto a la normalización de la secreción de insulina *in vitro* en estudios con islotes perifundidos aislados (previamente demostrado por nuestro grupo), conducirían al restablecimiento de la glucemia dentro de los niveles normales en los animales alimentados con AHB.

Estos resultados demuestran que el alto contenido de ácidos grasos polinosaturados n-3 y la baja relación n-6/n-3 PUFAs dietaria, promete ser un tratamiento



natural para la reversión del síndrome dislipidémico y sus efectos fisiopatológicos presentes en la diabetes tipo 2.

## **RESUMEN / SUMMARY**



## RESUMEN

Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que cambios en la composición de los macronutrientes de las dietas son un factor importante en la prevención o mejoramiento de numerosos desórdenes metabólicos incluidos en el llamado “Síndrome Plurimetabólico” o “Síndrome X”, tales como: diabetes tipo 2, resistencia insulínica, dislipidemia, hipertensión y obesidad; todos ellos de alta prevalencia en nuestra población y a nivel mundial (Cheal y col., 2004) (Clarke, 2001) (Mori y Beilin, 2001). Al respecto un importante número de estudios a nivel experimental y humanos, incluidos de nuestro grupo, indican que los ácidos grasos polinsaturados (PUFAs) de origen marino: eicosapentaenoico 20:5 n-3 (EPA) y docosahexaenoico 22:6 n-3 (DHA) se encuentran involucrados en numerosos procesos biológicos, jugando un rol beneficioso contra los efectos adversos de este síndrome (Lombardo y Chicco, 2006).

A nivel experimental existen numerosos modelos animales genéticos, farmacológicos y nutricionales de dislipidemia, diabetes tipo 2, resistencia insulínica y adiposidad visceral (dietas ricas en grasas saturadas, dietas ricas en hidratos de carbono, modificación del tipo de ácido graso, etc.), que se utilizan para analizar las dismetabolías involucradas en este síndrome.

Entre los modelos nutricionales, en la presente tesis utilizamos el modelo experimental nutricional de dislipidemia, resistencia insulínica, anormal homeostasis de la glucosa y adiposidad visceral inducido por ingesta crónica (8 meses) de una dieta rica en sacarosa (DRS) y hemos analizado a nivel hepático: I) Mecanismos relacionados con la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos. Expresión de la masa proteica de los receptores nucleares PPAR- $\alpha$  y LXR- $\alpha$ ; composición lipídica microsomal; II) Regulación del metabolismo de la glucosa: vías oxidativa y no oxidativa y vías de la cascada de señalización de la insulina; III) Efecto de la sustitución de la fuente grasa dietaria (aceite de maíz (AM) -rico en n-6, por aceite de hígado de bacalao (AHB) -rico en n-3), sobre los mecanismos que conducen a la reversión y/o mejoramiento de la dislipemia y el metabolismo de la glucosa a nivel enzimático y molecular.

Los resultados obtenidos en los animales dislipémicos demuestran: 1) las enzimas hepáticas relacionadas con la lipogénesis “de novo” y la expresión de la masa proteica del LXR- $\alpha$  se incrementaron; 2) la oxidación de ácidos grasos disminuyó asociado a una menor actividad CPT 1, una actividad normal de FAO y menor masa proteica del PPAR- $\alpha$ ; 3) la expresión de  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasa y la actividad de  $\Delta 6$  desaturasa se incrementaron,



mientras que disminuyó la expresión de SCD-1; 4) la DRS incrementó los n-6 y disminuyó los n-3 PUFAs en los lípidos hepáticos, provocando incrementos significativos de los ácidos grasos n-6 a expensas del 18:2 dietario. Dado el aumento de lípidos hepáticos, examinamos las especies moleculares de los lípidos microsomales (fosfatidilcolina) los cuales fueron principalmente ricos en 20:4 n-6 PUFAs.; 5) los efectos mencionados anteriormente condujeron a un incremento de ácidos grasos y triglicéridos hepáticos con la consecuente mayor secreción in vivo de VLDL-Tg, y que junto a una menor remoción de triglicéridos plasmáticos explicaría la dislipidemia presente en estos animales.

Por otro lado, examinando las secuencias metabólicas de la glucosa y algunos intermediarios claves, involucrados en la cascada de señales de la acción insulínica, demostramos: 6) reducción en la fosforilación de la glucosa, asociada a una menor actividad GK; 7) aumento de la vía no oxidativa de la glucosa, dada una mayor actividad GS y consecuentemente un incremento en el contenido de glucógeno hepático sin modificaciones en los niveles de G-6-P; 8) aumento de la vía glicolítica, atribuido a una mayor actividad PK sin modificaciones en los niveles de F-2,6-P<sub>2</sub>. Esto se acompañó de un incremento en la actividad del complejo PDH (PDHa) indicando una mayor oxidación de la glucosa; 9) vía gluconeogénica alterada (mayor actividad G-6-P-Pasa y PEPCK); y 10) menor expresión de la masa proteica del IRS-1 y de la subunidad  $\alpha$ p85 PI3K. La menor actividad GK y el incremento en la actividad G-6-P-Pasa y PEPCK sugieren una mayor salida hepática de glucosa que estaría relacionado con la hiperglucemia presente en estos animales.

Mediante la sustitución del AM por AHB, demostramos: 1) normalización en la actividad de enzimas lipogénicas y disminución de la masa proteica del LXR- $\alpha$  conjuntamente con una mayor oxidación de ácidos grasos (incremento de actividad FAO y CPT 1) y un incremento en la expresión de la masa proteica del PPAR- $\alpha$ . Esto indica una menor síntesis de novo de ácidos grasos y un incremento de las vías oxidativas que sumado a una menor disponibilidad hepática de ácidos grasos plasmáticos contribuirían a la reversión de la esteatosis hepática y dislipidemia; 2) la actividad y expresión de las desaturasas: SCD-1,  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  retornaron a los niveles del grupo control; 3) la normalización en el metabolismo lipídico condujo a una disminución de la secreción de VLDL-Tg y remoción plasmática de triglicéridos normalizando la dislipidemia; 4) la administración de AHB incrementó los n-3 y disminuyó los n-6 PUFAs en los lípidos hepáticos, sin alterar la relación 18:1 / 18:0; 5) las especies moleculares de los lípidos microsomales, mostraron un desplazamiento de n-6 por n-3 PUFAs a través de un mecanismo de competición



directa. Estos cambios pueden afectar la fluidez y estructura de las membranas celulares y favorecer la acción insulínica; 6) se revirtió la anormal homeostasis de la glucosa sin modificación de los niveles de insulina plasmática.

En lo que se refiere al análisis de las secuencias metabólicas de la glucosa e intermediarios claves, involucrados en la cascada de señales de la acción insulínica, demostramos: 7) normalización del contenido de glucógeno hepático y las actividades enzimáticas PEPCK, G-6-P-Pasa y la forma activa (PDHa) del complejo PDH; 8) el AHB fue capaz de mejorar las actividades GS y PK; 9) no se observaron modificaciones en la actividad GK y en la masa proteica del IRS-1 y de la subunidad  $\alpha p85$  PI3K, cuyos valores permanecieron similares al lote DRS. Sin embargo, la reversión de la resistencia insulínica periférica global y el mejoramiento de la sensibilidad insulínica a nivel hepático, junto a la normalización de la secreción de insulina in vitro en estudios con islotes perifundidos aislados (previamente demostrado por nuestro grupo), conducirían al restablecimiento de la glucemia dentro de los niveles normales en los animales alimentados con AHB.

Estos resultados demuestran que el alto contenido de ácidos grasos polinosaturados n-3 y la baja relación n-6/n-3 PUFAs dietaria, promete ser un tratamiento natural para la reversión del síndrome dislipidémico y sus efectos fisiopatológicos presentes en la diabetes tipo 2.



## SUMMARY

Numerous epidemiological and experimental studies suggest that changes in the macronutrient composition of diets are an important factor in the prevention or improvement of many metabolic disorders included in the "Plurimetabolic Syndrome" or "Syndrome X", such as: type 2 diabetes, insulin resistance, dyslipidemia, hypertension and obesity, all of which are highly prevalent in our population and worldwide (Cheal et al., 2004) (Clarke, 2001) (Mori and Beilin, 2001). In this regard a large number of experimental studies and human level, including our group, indicate that polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of marine origin: 20:5 n-3 eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic 22:6 n-3 (DHA) are involved in many biological processes, playing a beneficial role against the adverse effects of this syndrome (Lombardo and Chicco, 2006).

At experimental level, there are many genetic, pharmacological and nutritional animal models of dyslipidemic, type 2 diabetes, insulin resistance and visceral fat (saturated fat diets, diets rich in carbohydrates, change in the rate of fatty acid, etc.), which are used to analyze the dismetabolias involved in this syndrome.

Among the nutritional models, in this thesis we used the nutritional experimental model of dyslipidemia, insulin resistance, abnormal glucose homeostasis and visceral adiposity induced by chronic intake (8 months) of a rich sucrose diet (SRD) and we analyzed in liver: I) mechanisms related to lipogenesis and fatty acid oxidation. Expression of the protein mass of PPAR- $\alpha$  and LXR- $\alpha$  nuclear receptors; microsomal lipid composition; II) Regulation of glucose metabolism: oxidative and nonoxidative pathways and routes of the cascade of insulin signaling; III) Effect of the replacement of dietary fat source (corn oil (CO) -rich in n-6 for cod liver oil (CLO) -rich in n-3), the mechanisms that lead to the reversal and/or improvement of dyslipidemia and glucose metabolism at enzyme and molecular level.

The results obtained in dyslipemic animals show: 1) liver enzymes related to lipogenesis de novo and protein mass expression of LXR- $\alpha$  were increased; 2) decreased fatty acid oxidation associated with a lower CPT 1 activity, a normal FAO activity and lower PPAR- $\alpha$  protein mass; 3) the expression of  $\Delta 6$  and  $\Delta 5$  desaturase and  $\Delta 6$  desaturase activity increased, while the expression of SCD-1 decreased; 4) the SRD increased n-6 and decreased n-3 PUFAs in liver lipids, causing significant increases of the n-6 fatty acids at expense of 18:2 dietary fatty acid. Given the liver lipids increased, we examined the



molecular species of microsomal lipids (phosphatidylcholine) which were mainly rich in 20:4 n-6 PUFAs; 5) the effects mentioned above led to an increase in liver fatty acids and triglycerides with consequent increased in vivo secretion of VLDL-Tg, and with the reduced clearance of plasma triglycerides explain the dyslipidemia present in these animals.

On the other hand, examining glucose metabolic sequences and some key intermediaries, involved in the signals cascade of insulin action, we demonstrate: 6) reduction in glucose phosphorylation, associated with a lower GK activity; 7) increased in the non-oxidative glucose, given a higher GS activity and consequently an increase in liver glycogen content without changes in G-6-P levels; 8) increase in the glycolytic pathway, attributed to increased PK activity without changes in F-2,6-P<sub>2</sub> levels. This was accompanied by an increase of the PDH complex activity (PDHa) indicating increased glucose oxidation; 9) altered gluconeogenic pathway (increased G-6-P-Pase and PEPCK activity); and 10) decreased expression of the IRS-1 and  $\alpha$ p85 PI3K subunit mass protein. The lower GK activity and increased G-6-P-Pase and PEPCK activities suggest that greater hepatic glucose output might be related to the hyperglycemia present in these animals.

By replacing the CO by CLO, we demonstrated: 1) normalization of lipogenic enzymes activities and decreased protein mass of LXR- $\alpha$  in conjunction with increased fatty acid oxidation (increased FAO and CPT 1 activity) and an increase in the expression of the protein mass of PPAR- $\alpha$ . This indicates a lower de novo fatty acids synthesis and increased oxidative pathways and combined with a decreased hepatic availability of plasma fatty acids, would contribute to the reversal of hepatic steatosis and dyslipidemia; 2) the activity and expression of desaturases: SCD-1,  $\Delta$ 6 and  $\Delta$ 5 returned to normal levels; 3) the normalization of lipid metabolism led to a decreased secretion of VLDL-Tg and plasma triglyceride clearance normalizing dyslipidemia; 4) the administration of CLO increased the n-3 and decreased the n-6 PUFAs in liver lipids, without altering the 18:1 / 18:0 ratio; 5) the molecular species of microsomal lipids, showed a shift of n-6 to n-3 PUFAs through a direct competition mechanism. These changes can affect the flow and structure of cell membranes and promote insulin action; 6) reversed the abnormal glucose homeostasis without modifying the levels of plasma insulin.

In regard to the analysis of glucose metabolic sequences and key intermediates, involved in the signaling cascade of insulin action, we demonstrate: 7) normalization of hepatic glycogen content and PEPCK, G-6-P-Pase enzymes activities and the active form



of the PDH complex (PDHa); 8) CLO was able to improve GS and PK activities; 9) no significant changes in GK activity and in the protein mass of IRS-1 and the subunit  $\alpha$ 85 PI3K were shown, whose values remained similar to the SRD. However, the reversal of global peripheral insulin resistance and improving insulin sensitivity in the liver, with normalization of insulin secretion in vitro studies with isolated islets perifundidos (previously demonstrated by our group), would lead to the restoration of glycemic within normal levels in animals fed CLO.

These results demonstrate that the high content of n-3 PUFAs and the combined effect of n-6/n-3 PUFA ratio depression promise to be a natural treatment to revert the dyslipidemic syndrome and its pathophysiological effects present in type 2 diabetes.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

-  Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA and Wakil SJ. (2001). Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science*, 291: 2613-2616.
-  Abumrad N, Coburn C and Ibrahimi A. (1999). Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochem. Biophys. Acta*, 1441: 4-13.
-  Adeli K, Taghibiglou C, Van Iderstine SC, Lewis GF. (2001). Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 11: 170-176.
-  Ader M, Bergman RN. (1990). Peripheral effects of insulin dominate suppression of fasting hepatic glucose production. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 258: E1020-1032.
-  Aiston S, Trinh KY, Lange AJ, Newgard CB and Aguirre Lorraine. (1999). Glucose-6-phosphatase overexpression lowers glucose-6-phosphate and inhibits glycogen synthesis and glycolysis in hepatocytes without affecting glucokinase translocation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(35): 24559-24566.
-  Bantle JP. (2009). Dietary fructose and metabolic syndrome and diabetes. *J. Nutr.*, 139: 1263S-1268S.
-  Barthel A and Schmoll D. (2003). Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 285: E685-E692.
-  Basciano H, Federico L and Adeli K. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & Metabolism*, 2(1): 5.
-  Beaty NB and Lane MD. (1983). Kinetics of activation of acetyl-CoA carboxylase by citrate. Relationship to the rate of polymerization of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 258: 13043-13050.
-  Bell KS, Schmitz-Peiffer C, Lim-Fraser M, Biden TJ, Cooney GJ and Kraegen EW. (2000). Acute reversal of lipid-induced muscle insulin resistance is associated with



- rapid alteration in PKC  $\theta$  localization. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 279: 1196-1201.
-  Bell M, Wang H, Chen H, McLenithan JC, Gong DW, Yang RZ, Yu D, Fried SK, Quon MJ, Londos C and Sztalryd C. (2008). Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells. Abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. *Diabetes*, 57: 2037-2045.
-  Berge RK, Madsen L, Vaagenes H, Tronstad KJ, Göttlicher M and Rustan AC. (1999). In contrast with docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid and hypolipidaemic derivatives decrease hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreased diacylglycerol acyltransferase activity and stimulation of fatty acid oxidation. *Biochem. J.*, 343: 191-197.
-  Bergmeyer HU. (1963). *Methods of Enzymatic Analysis*. 2° English edition, volume 2, (Bergmeyer HU, ed.). New York and London Academic Press.
-  Bergmeyer HU. (1974). *Methods for determination of metabolites*. *Methods of enzymatic analysis*. 2° English edition, (Bergmeyer HU, ed.). New York Academic Press.
-  Bernal C, Basílico MZ, Gutman R, Lombardo YB. (1989). Secretion and removal rates of very low-density lipoprotein triglycerides at the three metabolic periods of hypertriglyceridemia induced by a sucrose rich diet. *Nutr. Rep. Int.*, 40: 71-83.
-  Bernal C, Gutman R and Lombardo YB. (1995). The duration of feeding on a sucrose-rich diet determines variable in vitro effects of insulin and fructose in rat liver triglyceride metabolism. *J. Nutr. Biochem.*, 6: 422-430.
-  Berthou L, Saladin R, Yaqoob P, Branellec D, Calder P, Fruchart JC, Denèfle P, Auwerx J, Staels B. (1995). Regulation of rat liver apolipoprotein A-I, apolipoprotein A-II and acyl-coenzyme A oxidase gene expression by fibrates and dietary fatty acids. *Eur. J. Biochem.*, 232(1): 179-187.
-  Bezerra RMN, Ueno M, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CRO and Saad MJA. (2000). A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J. Nutr.*, 130: 1531-1535.



-  Bizeau ME, Pagliassotti MJ. (2005). Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metabolism Clinical and Experimental*, 54: 1189-1201.
-  Bizeau ME, Thresher JS & Pagliassotti MJ. (2001). A high-sucrose diet increase glucose-6-phosphatase and glucose release and decrease glucokinase in hepatocytes. *J. Appl. Physiol.*, 91: 2041-2046.
-  Blakely SR, Hallfrisch J, Reiser S and Prather ES. (1981). Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. *J. Nutr.*, 111: 307-314.
-  Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, Xiang X, Luo Z and Ruderman N. (2005). Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor- $\kappa$ B pathway in rat liver. *Diabetes*, 54: 3458-3465.
-  Bradbury MW. (2006). Lipid Metabolism and Liver Inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 290: G194-G198.
-  Brandt H, Killilea SD and Lee EYC. (1974). Activation of phosphorylase phosphatase by a novel procedure: Evidence for a regulatory mechanism involving the release of a catalytic subunit from enzyme-inhibitor complex (ES) of higher molecular weight. *Biochem. And Biophys. Res. Comm.*, 61(2): 598-604.
-  Brandt JM, Djouadi F, Kelly DP. (1998). Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, 273: 23786-23792.
-  Brenner RR, Bernasconi AM, Garda HA. (2000). Effect of experimental diabetes on the fatty acid composition, molecular species of phosphatidyl-choline and physical properties of hepatic microsomal membranes. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids*, 63: 167-176.
-  Brenner RR, Rimoldi OJ, Lombardo YB, González MS, Bernasconi AM, Chicco AG and Basabe JC. (2003). Desaturase activities in rat model of insulin resistance induced by a sucrose-rich diet. *Lipids*, 38: 733-742.



-  Brenner RR. (2008). Mechanisms by which diet and other endogenous factors modify the microsomal membrane fatty acid composition, structure, physical properties and membrane bound protein function. In: *Advances in Lipids Metabolism*, edited by Giménez MS, Research Signpost, Kerala, India, 69-95.
-  Browsers JFHM, Gadella BM, Lambert MG, Van Golde LMG, Tielens AGM. (1998). Quantitative analysis of phosphatidylcholine molecular species by HPLC and light-scattering detection. *J. Lipid Res.*, 39: 344-353.
-  Brownsey RW and Denton RM. (1982). Evidence that insulin activates fat-cell acetyl-CoA carboxylase by increased phosphorylation at a specific site. *Biochem. J.*, 202: 77-86.
-  Burnol A, Ferre P, Leturque A and Girard J. (1984). Technics for studying insulin resistance in vivo. *Ann. Endocrinol.*, 45(6): 375-379.
-  Cairo S, Merla G, Urbinati F, Ballabio A, Reymond A. (2001). WBSCR14, a gene mapping to the Williams-Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network. *Hum. Mol. Genet.*, 10: 617-627.
-  Chang BHJ and Chan L. (2007). Regulation of Triglyceride Metabolism III. Emerging role of lipid droplet protein ADFP in health and disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 292: G1465-1468.
-  Chapman MJ, Miller LR and Ontko JA. (1973). Localization of the enzymes of ketogenesis in rat liver mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 58: 284-306.
-  Cheal KL, Abbasi F, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Ford ES. (2004). Relationship to insulin resistance of the adult treatment panel II diagnostic criteria for identification of the metabolic syndrome. *Diabetes*, 53: 1195-1200.
-  Cherrington AD. (1999). Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes*, 48: 1198-1214.
-  Chicco A, Basabe JC, Karabatas L, Ferraris N, Fortino A and Lombardo YB. (2000) Troglitazone (CS-045) normalizes hypertriglyceridemia and restores the altered patterns of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipidemic rats. *Metabolism*, 49: 1346-1351.



- Chicco A, D'Alessandro ME, Karabatas L, Pastorale C, Basabe JC and Lombardo YB. (2003). Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in Insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *J. Nutr.*, 133: 127-133.
- Chicco A, D'Alessandro ME, Karabatas L, Gutman R, Lombardo YB. (1996). Effect of moderate levels of dietary fish oil on insulin secretion and sensitivity, and pancreas insulin content in normal rats. *Ann. Nutr. Metab.*, 40(2): 61-70.
- Chicco A, Gutman R and Lombardo YB. (1991). Biochemical abnormalities in the heart of rats fed a sucrose-rich diet: is the low activity of the pyruvate dehydrogenase complex a result of increased fatty acid oxidation?. *Metabolism*, 40 (1): 15-21.
- Chicco A, Soria A, Fainstein-Day P, Gutman R, Lombardo YB. (1994). Multiphasic metabolic changes in the heart of rats fed a sucrose-rich diet. *Horm. Metab. Res.*, 26: 397-403.
- Christiansen EN, Luna JS, Roetveit T, Rustan AC. (1991). Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver. *Biochem. Biophys Acta*, 1082: 57-62.
- Chunli Y, Chen Y, Cline GW, Ahang D, Zong H, Wang Y, Bergerson R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J. Biol. Chem.*, 277: 50230-50236.
- Clarke SD, Armstrong MK and Jump DB. (1990). Nutritional control of rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA abundance. *J. Nutr.*, 120: 218-224.
- Clarke SD. (1993). Regulation of fatty acid synthase gene expression: an approach for reducing fat accumulation. *Journal of Animal Science*, 71(7): 1957-1965.
- Clarke SD. (2001). Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J. Nutr.*, 131: 1129-1132.
- Coe NR and Bernlohr DA. (1998). Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1391: 287-306.



-  Cohen AM, Briller S and Shafrir E. (1972). Effect of longterm sucrose feeding on the activity of some enzymes regulating glycolysis, lipogénesis and gluconeogenesis in rat liver and adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, 279(1): 129-138.
-  Collier JJ and Scott DK. (2004). Sweet Changes: Glucose Homeostasis can be altered by manipulating genes controlling hepatic glucose metabolism. *Molecular Endocrinology*, 18(5): 1051-1063.
-  Connor WE. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71 (Supl): 171S-175S.
-  Cooper AD. (1997). Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J. Lipid Res.*, 38: 2173-2192.
-  D'Alessandro ME, Chicco A, Karabatas L and Lombardo YB. (2000). Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil. *J. Nutr. Biochem.*, 11: 273-280.
-  Da Silva LA, De Marcucci OL and Kuhnle ZR. (1993). Dietary polyunsaturated fats suppress the high-sucrose-induced increase of rat liver pyruvate dehydrogenase levels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1169: 126-134.
-  Da Silva LA, Marcucci OL and Kuhnle ZR. (1993). Dietary polyunsaturated fats suppress the high-sucrose-induced increase of rat liver pyruvate dehydrogenase levels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1169: 126-134.
-  Davidson AL and Arion WJ. (1987). Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts: Physiological implications of higher cellular activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 253: 156-167.
-  Davies DR, Detheux M, van Schaftingen E. (1990). Fructose-1-phosphate and the regulation of glucokinase activity in isolated hepatocytes. *Eur. J. Biochem.*, 192: 283-289.
-  De Fronzo RA, Tobin JD and Andres R. (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am. J. Physiol.*, 237: 214-223.



-  De La Iglesia N, Mukhtar M, Seoane J, Guinovart JJ and Agius L. (2000). The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(14): 10597-10603.
-  Den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. (2004). Hepatic Steatosis: A mediator of the metabolic syndrome lessons from animal models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24: 644-649.
-  Dentin R, Benhamed F, Pegorier JP, Foufelle F, Viollet B, Vaulont S, Girard J, Postic C. (2005). Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J. Clin. Invest.*, 115: 2843-2854.
-  Dentin R, Denechaud PD, Benhamed F, Girard J and Postic C. (2006). Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *J. Nutr.*, 136: 1145-1149.
-  Desvergne B, Michalik L and Wahli W. (2006). Transcriptional Regulation of Metabolism. *Physiol. Rev.*, 86: 465-514.
-  Desvergne B, Wahli W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.*, 20:649-688.
-  Dobrzyn A, Ntambi JM. (2005). The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 73: 35-41.
-  Doege H, Baillie RA, Ortegon AM, Tsang B, Wu Q, Punreddy S, Hirsch D, Watson N, Gimeno RE and Stahl A. (2006). Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology*, 130: 1245-1258.
-  Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Ederly M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfine IW. (1985). The human IR cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signaling. *Cell*, 40: 747-758.
-  Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K and Havel PJ. (2002). Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76: 911-922.



- Enriquez YR. (2002). Interpretaciones recientes sobre el metabolismo lipídico en la resistencia a la insulina. *Rev. Cub. Aliment. Nutr.*, 16(1): 54-62.
- Erskine JM, Jesnsen DR and Eckel RH. (1994). Macronutrient regulation of lipoprotein lipase is posttranslational. *J. Nutr.*, 124: 500-507.
- Federici M, Hubal M, Perego L, Ranalli M, Caradona Z, Perego C, Usellini L, Nano R, Bonini P, Bertizzi F, Marlier LN, Davalli AM, Casadente O, Pontiroli AE, Gerry M, Marchetti P, Lauro R, Sesti G, Folli F. (2001). A potential role for regulation of specific Bcl family genes toward apoptotic cell death program. *Diabetes*, 50: 1290-1301.
- Fiske CH and Subbarow P. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chemistry*, 66: 375.
- Folch J, Lees M and Sloane Stanley GH. (1957). A Simple Method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509.
- Foretz M, Guichard C, Ferré P and Foufelle F. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *PNAS*, 96(22): 12737-12742.
- Galante P, Maerker E, Scholz R, Rett K, Herberg L, Mosthaf L, Haring HU. (1994). Insulin-induced translocation of GLUT 4 in skeletal muscle of insulin-resistant Zucker rats. *Diabetologia*, 37: 3-9.
- Gannon MC, Nuttall FQ, Grant CT, Ercan-Fang S and Ercan-Fang N. (1998). Stimulation of insulin secretion by fructose ingested with protein in people with untreated type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 21: 16-22.
- Gannon MC, Nuttall FQ, Krezowski PA, Billington CJ and Parker S. (1986). The serum insulin and plasma glucose responses to milk and fruit products in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*, 29: 784-791.
- Gergely P, Tóth B, Farkas I and Bot G. (1985). Effect of fructose-1-phosphate on the activation of liver glycogen synthase. *Biochem. J.*, 232: 133-137.



-  Girard J, Ferré P Foufelle F. (1997). Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu. Rev. Nutr.*, 17: 325-352.
-  Girard J. (2006). Insulin's effect on the liver: "Direct or indirect?" continues to be the question. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(2): 302-304.
-  Goglia F, Liverini G, Lanni A, Iossa S & Barletta A. (1989). Morphological and functional modifications of rat liver peroxisomal subpopulations during cold exposure. *Exp. Biol.*, 48: 127-133.
-  Golden S, Wals PA, Katz J. (1997). An improved procedure for the assay of glycogen synthase and phosphorylase in rat liver homogenates. *Anal. Biochem.*, 77: 436-445.
-  Goodwin GW, Zhang B, Paxton R and Harris RA. (1988). Determination of activity and activity state of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase in rat tissues. *Methods Enzymol.*, 166: 189-201.
-  Granner D and Pilkis Simon. (1990). The genes of hepatic glucose metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(18): 10173-10176.
-  Granner D, Andreone T, Sasaki K & Beale E. (1983). Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin. *Nature*, 305: 549-551.
-  Greenhouse DD, Michaelis OE, McCune SA. (1991). The development of corpulent rat strains. In: Shafir, E. Ed. *Frontiers in diabetes research: lessons from animal diabetes III*. London: John Libbey. pp: 375-377.
-  Guinovart JJ, Salavert A, Massagué J, Ciudad CJ, Salsas E and Itarte E. (1979). Glycogen Synthase: a new activity ratio assay expressing a high sensitivity to the phosphorylation state. *FEBS Letters*, 106: 284-288.
-  Gutman R, Basílico MZ, Bernal C, Chicco A, Lombardo Y. (1987). Long-Term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose rich diet. *Metabolism*, 36: 1013-1020.



-  Gutman R, Basílico MZ, Mocchiutti N, Chicco A and Lombardo YB. (1985). Diazoxide prevents the development of hormonal and metabolic abnormalities present in rats fed a sucrose rich diet. *Horm. Metab. Res.*, 17: 491-494.
-  Halestrap AP and Denton RM. (1973). Insulin and the regulation of adipose tissue acetylCoA carboxylase. *Biochem. J.*, 132: 509-517.
-  Halvorsen B, Rustan AC, Madsen L, Reseland J, Berge RK, Sletnes P, Christiansen EN. (2001). Effects of long-chain monounsaturated and n-3 fatty acids on fatty acid oxidation and lipid composition in rats. *Ann. Nutr. Metab.*, 45 (1): 30-37.
-  Harris WS, Hustvedt BE, Haegen E, Green MH, Lu G, Drevon CA. (1997). N-3 fatty acids and chylomicron metabolism in the rat. *J. Lipid Res.*, 38: 503-515.
-  Harris WS. (1989). Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *J. Lipid Res.*, 30: 785-807.
-  Hegardt FG. (1999). Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochemical Journal*, 338: 569-582.
-  Herberg L and Coleman DL. (1977). Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes. *Metabolism*, 26: 59-99.
-  Herbert V, Lau KS, Gottlieb CH, Bleicher S. (1965). Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 25: 1375-1384.
-  Hertz R, Magenheimer J, Berman I, Bar-Tana J. (1998). Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear receptor 4-alpha. *Nature*, 392: 512-516.
-  Herzberg GR and Rogerson M. (1988). Hepatic fatty acid synthesis and triglycerides secretion in rats fed fructose or glucose based diets containing corn oil, tallow or marine oil. *J. Nutr.*, 118: 1061-1067.
-  Houston MC, Egan BM. (2005). The Metabolic Syndrome. Pathophysiology, diagnosis, clinical aspects, prevention and nonpharmacologic treatment: Emphasis on lifestyle modifications, nutrition, nutritional supplements, vitamins, minerals, antioxidants, weight management and exercise. *J. Am. Nutraceuticals Assoc.*, 8(2): 3-83.



-  Hsu RY, Lardy HA. (1969). Malic enzyme. In: *Methods in Enzymology* (Lowenstein, JM, ed.), vol XIII, pp 230-235. Academic Press, New York.
-  Huijing F. (1970). A rapid enzymatic method for glycogen estimation in very small tissue samples. *Clin. Chem. Acta*, 33: 567-572.
-  Hwang D. (2000). Fatty acids and immune responses - a new perspective in searching for clues to mechanism. *Annu. Rev. Nutr.*, 20: 431-456.
-  Igal RA, Wang S, Gonzalez-Baró M and Coleman RA. (2001). Mitochondrial Glycerol Phosphate Acyltransferase Directs the Incorporation of Exogenous Fatty Acids into Triacylglycerol. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 42205-42212.
-  Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 7281-7286.
-  Ijpenberg A, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. (1997). Polarity and specific sequence requirement of PPAR-RXR heterodimer binding to DNA: a functional analysis of the malic enzyme gene PPRE. *J. Biol. Chem.*, 272: 20108-20117.
-  Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, Collins JL, Osborne TF, Tontonoz P. (2002). Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem.*, 277(13): 11019-11025.
-  Jump DB and Clarke SD. (1999). Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu. Rev. Nutr.*, 19: 63-90.
-  Jump DB. (2002a). The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(11): 8755-8758.
-  Jump DB. (2002b). Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.*, 13: 155-164.
-  Kabashima T, Kawaguchi T, Wadzinski BE, Uyeda K. (2003). Xylulose-5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose-5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 5107-5112.



-  Kaku K, Province M, Permutt MA. (1989). Genetic analysis of obesity-induced diabetes associated with a limited capacity to synthesize insulin in C57BL/Ks mice: evidence for polygenic control. *Diabetologia*, 32: 636-643.
-  Karlic H, Lohninger S, Koeck T, Lohninger A. (2002). L-carnitine stimulates carnitine acyltransferases in the liver of aged rats. *J. Histochem. Cytochem.*, 50: 205-212.
-  Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M and Natori T. (1992). Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*, 41: 1422-1428.
-  Kergoat M, Bailbé D and Portha B. (1987). Effect of high sucrose diet on insulin secretion and insulin action: a study in the normal rat. *Diabetología*, 30: 252-258.
-  Kim HJ, Takahashi M and Ezaki O. (1999). Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. *J. Biol. Chem.*, 274: 25892-25898.
-  Klimes I, Seböková E, Vrána A and Kazdová L. (1993). Raised dietary intake of n-3 polyunsaturated fatty acids in high sucrose-induced insulin resistance. *Animal studies*. Klimes I, Howard BV, Storlien LH, Seböková E, (Ed) *Dietary lipids and insulinaction*. Second International Smolenice Insulin Symposium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 683: 69.
-  Kobayashi K, Forte TM, Taniguchi S, Ishida BY, Oka K, Chan L. (2000). The db/db mouse, a model for diabetic dislipidemia: molecular characterization and effects of western diet feeding. *Metabolism*, 49: 22-31.
-  Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ and Storlien LH. (1991). Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes*, 40: 1397-1403.
-  Kraegen EW, James DE, Storlien LH, Burleigh KM and Chisholm DJ. (1986). In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: Assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration. *Diabetologia*, 29: 192-198.



-  Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, 106: 2747-2757.
-  Laube H, Klör HU, Fussgänger R and Pfeiffer EF. (1973). The effect of starch, sucrose, glucose and fructose on lipid metabolism in rats. *Nutr. Metab.*, 15: 273-280.
-  Laurell S. (1966). A method for routine determination of plasma triglyceride. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, 18: 668-672.
-  Lawrence JC, Roach PJ. (1997). New insights into the role and mechanisms of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes*, 46: 541-547.
-  Le Roith D, Zick Y. (2001). Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care*, 24: 588-597.
-  Legrand PD, Catheline DE, Fichot MC, Lemarchal P. (1997). Inhibiting delta 9 desaturase activity impairs triacylglycerol secretion in cultured chicken hepatocytes. *J. Nutr.*, 127: 249-256.
-  Lewis B, Boberg J, Carlson LA. (1972). Determination of the intravenous fat tolerance test with Intralipid by nephelometry. *Atherosclerosis*, 1: 83-86.
-  Lewis G, Carpentier A, Khosrow A., Giacca A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 23: 201-229.
-  Lewis GF. (1997). Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr. Opin. Lipidol.*, 8(3): 146-153.
-  Li AC and Glass CK. (2004). PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J. Lipid Res.*, 45: 2161-2173.
-  Liimatta M, Towle HC, Clarke S and Jump DB. (1994). Dietary polyunsaturated fatty acids interfere with the insulin/glucose activation of L-type pyruvate kinase gene transcription. *Molecular Endocrinology*, 8: 1147-1153.
-  Lombardo YB and Chicco A. (2008). Biochemical and molecular mechanisms of n-3 polyunsaturated fatty acids. Effects in obesity, insulin resistance and cardiovascular dysfunction. *Advances in Lipids Metabolism*, 43-68.



-  Lombardo YB, Chicco A, D'Alessandro ME, Martinelli M, Soria A and Gutman R. (1996). Dietary fish oil normalizes dyslipemia 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, Rodi M, Nusimovich B and Gutman R. (1983). Effects of sucrose diet on insulin secretion in vivo and in vitro and triglyceride storage and mobilization of heart of rats. *Horm. Metab. Res.*, 15:69-76.
-  Lombardo YB, Chicco A. (2006). Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J. Nutr. Biochem.*, 17: 1-13.
-  Lombardo YB, Drago S, Chicco A, Fainstein-Day P, Gutman R, Gagliardino JJ & Gomez-Dumm CL. (1996a). Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. *Metabolism*, 45: 1527-1532.
-  Lombardo YB, Hein G, Chicco A. (2007). Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids*, 42: 427-437.
-  Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
-  Lu TT, Repa JJ, Mangelsdorf DJ. (2001). Orphan nuclear receptors as eLiXIRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J. Biol. Chem.*, 276: 37735-37738.
-  Ma L, Tsatsos NG, Towle HC. (2005). Direct role of ChREBP.Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes. *J. Biol. Chem.*, 280:12019-12027.
-  Mack DO, Watson JJ and Johnson BC. (1975). Effect of dietary fat and sucrose on the activities of several rat hepatic enzymes and their diurnal response to a meal. *J. Nutr.*, 105: 701-713.
-  Magnuson M. (1992). Tissue-specific regulation of glucokinase gene expression. *J. Cell. Biochem.*, 48: 115-121.



-  Majerus PW and Kilburn E. (1969). Acetyl coenzyme A carboxylase. The roles of synthesis and degradation in regulation of enzyme levels in rat liver. *J. Biol. Chem.*, 244: 6254-6262.
-  Mandarino LJ. (1989). Regulation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase and glycogen synthase in man. *Diabetes Metab. Rev.*, 5(6): 475-486.
-  Marquiè G, Hadjiisky P, Araud O, Duhault J. (1991). Development of macroangiopathy in sand rat (*Psammomys obesus*) an animal model of non-insulin dependent diabetes mellitus. Effect of glicazide. *Am. J. Med.*, 90: 55A-61A.
-  Martin RJ, Welton RF, Baumgardt BR. (1973). Adipose and liver tissue enzyme profiles in obese hyperglycemic mice. *Medicine Proceedings*, 142: 241-245.
-  Massillon D, Barzilai N, Hawkins M, Prus-Wertheimer D & Rossetti L. (1997). Induction of hepatic glucose-6-phosphatase gene expression by lipid infusion. *Diabetes*, 46: 153-157.
-  Massillon D. (2001). Regulation of the glucose-6-phosphatase gene by glucose occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: Differential effect of glucose and xylitol. *J. Biol. Chem.*, 276: 4055-4062.
-  Mathe D. (1995). Dyslipidemia and diabetes: animal models. *Diabetes Metab.*, 21: 106-111.
-  Matsuda T, Noguchi T, Yamada K, Takenaka M and Tanaka T. (1990). Regulation of the gene expression of glucokinase and L-type pyruvate kinase in primary culture of rat hepatocytes by hormones and carbohydrates. *J. Biochem.*, 108: 778-784.
-  Matsumoto M, Ogawa W, Akimoto K, Inouse H, Miyake K, Furukawa K, Hayashi Y, Iguchi H, Matsuki Y, Hiramatsu R, Shimano H, Yamada N, Ohno S, Kasuga M, Noda T. (2003). PKC  $\lambda$  in liver mediates insulin-induced SREBP-1c expression and determines both hepatic lipid content and overall insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.*, 112: 935-944.
-  Mayes PA. (1993). Intermediary metabolism of fructose. *Am. J. clin. Nutr.*, 58: 754S-765S.



- McArthur MJ, Atshaves BP, Frolov A, Foxworth WD, Kier AB and Schroeder F. (1999). Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J. Lipid Res.*, 40: 1371-1383.
- McGarry JD, Robles-Valdes C and Foster DW. (1975). Role of carnitine in hepatic ketogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72(11): 4385-4388.
- McGarry JD, Woeltje KF, Kuwajima M, Foster DW. (1989). Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 5: 271-284.
- McManus RM, Jumpson J, Finegood DT, Clandinin MT and Ryan EA. (1996). A comparison of the effects of n-3 fatty acids from linseed oil and fish oil in well-controlled type II diabetes. *Diabetes Care*, 19: 463-467.
- Mihalik SJ, Steinberg SJ, Pei Z, Park J, Kim DG, Heinzer AK, Dacremont G, Wanders RJ, Cuebas DA, Smith KD and Watkins PA. (2002). Participation of two members of the very long-chain acyl-CoA synthetase family in bile acid synthesis and recycling. *J. Biol. Chem.*, 277: 24771-24779.
- Miller CW, Ntambi JM. (1996). Peroxisome proliferators induce mouse liver stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 9443-9448.
- Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, Kreuzsch A, Saez E. (2007). The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature*, 445: 219-223.
- Miyada KS, McCaw SE, Patel HV, Rachubinski RA, Capone JP. (1996). The orphan nuclear hormone receptor LXR- $\alpha$  interacts with the peroxisome proliferator-activated receptor and inhibits peroxisome proliferator signaling. *J. Biol. Chem.*, 271: 9189-9192.
- Miyazaki M, Dobrzyn A, Man WC, Chu K, Sampath H, Kim YC and Ntambi JM. (2004). Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 279(24): 25164-25171.
- Miyazaki M, Kim YC, Ntambi JM. (2001). A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase-1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *J. Lipid Res.*, 42: 1018-1024.



-  Monatanaro MA, González MS, Bernasconi AM, Brenner RR. (2007). Role of liver X receptor, insulin and peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  on in vivo desaturase modulation of unsaturated fatty acid biosynthesis. *Lipids*, 42: 197-210.
-  Montanaro MA, Lombardo YB, González 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 Leukot. Essent. Fatty Acids*, 72: 241-250.
-  Mori TA & Beilin LJ. (2001). Long-chain omega 3 fatty acids, blood lipids and cardiovascular risk reduction. *Curr. Opin. Lipidol.*, 12: 11-17.
-  Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, O'Neal DN, Best JD. (2000). Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71: 1085-1094.
-  Moriizumi S, Gourdon L, Lefrançois-Martinez AM, Kahn A, Raymondjean M. (1998). Effect of different basic helix-loop-helix leucine zipper factors on the glucose response unit of the L-type pyruvate kinase gene. *Gene expression*, 7(2): 103-13.
-  Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, Scherer PE and Rossetti L. (2004). Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 114: 232-239.
-  Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Megawa H, Kikkawa R and Kashiwagi A. (2002). Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR $\alpha$ . *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 282: E1180-E1190.
-  Nakanishi S and Numa S. (1970). Purification of rat liver acetyl-CoA carboxylase and immunochemical studies on its synthesis and degradation. *Eur. J. Biochem.*, 16: 161-173.
-  Neschen S, Moore I, Regittnig W, Yu CL, Wang Y, Pypaer M, Petersen KF, Shulman GI. (2002). Contrasting effects of fish oil and sunflower oil on hepatic, peroxisomal and tissue lipid content. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 282: E395-E401.



- Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B and Dumon H. (2008). Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92: 272-283.
- Nuttall FQ, Gilboe DP, Tan AWH, Doorneweerd DD, Theen JW, Gannon MC & Chou BB. (1981). In *The regulation of carbohydrate formation and utilization in mammals* (Veneziale, CM, ed), pp. 315-343, University Park Press, Baltimore.
- Osborne TF. (2000). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.*, 275: 32379-32382.
- Osterman J, Fritz PJ and Wuntch T. (1972). Pyruvate kinase isozymes from rat tissues. *The J. Biol. Chem.*, 248(3): 1011-1018.
- Otway S and Robinson D. (1967). The use of a non-ionic detergent (Triton WR 1339) to determine rates of triglyceride entry into the circulation of the rat under different physiological conditions. *J. Physiological*, 190: 321-330.
- Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, De Bose Boyd RA, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS. (2001). Unsaturated fatty acid inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein 1-c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 6027-6032.
- Pagliassotti MJ, Kang J, Thresher JS, Sung CK and Bizeau ME. (2002). Elevated basal PI 3-kinase activity and reduced insulin signaling in sucrose-induced hepatic insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 282: E170-E176.
- Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA and Pan DA. (1996). Changes in insulin action, triglycerides and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am. J. Physiol.*, 271: 1319-1326.
- Pagliassotti MJ, Sharokhi KA and Moscarello M. (1994). Involvement of liver and skeletal muscle in sucrose-induced insulin resistance: dose-response studies. *Am. J. Physiol.*, 266: R1637-R1644.
- Pagliassotti MJ, Wei Y and Bizeau M. (2003). Glucose-6-phosphatase activity is not suppressed but the mRNA level is increased by a sucrose-enriched meal in rats. *J. Nutr.*, 133: 32-37.



-  Pan DA, Mater MK, Thelen AP, Peters JM, Gonzalez FJ and Jump DB. (2000). Evidence against the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR  $\alpha$ ) as the mediator for polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic L-pyruvate kinase gene transcription. *J. Lipid Res.*, 41: 742-751.
-  Park OJ, Cesar D, Faix D, Wu K, Shackleton CHL and Hellerstein MK. (1992). Mechanisms of fructose-induced hypertriglyceridaemia in the rat. Activation of hepatic pyruvate dehydrogenase through inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochem. J.*, 282: 753-757.
-  Paward A, Xu J, Jerks E, Mangelsdorf DJ, Jump DB. (2002). Fatty acid regulation of liver X receptor (LXR) and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) in HEK 293 cells. *J. Biol. Chem.*, 277: 39243-39250.
-  Pedersen O, Kahn CR, Flier JS and Kahn BB. (1991). High fat feeding causes insulin resistance and a marked decrease in the expression of glucose transporters (Glut 4) in fat cells of rats. *Endocrinology*, 129: 771-777.
-  Peet DJ, Janowski BA and Magelsdorf DJ. (1998). The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8: 571-575.
-  Penicaud L, Ferre P, Terretaz J, Kinbanyan MF, Leturque A, Dore E, Girard J, Jeanrenaud B and Picon L. (1987). Development of obesity in Zucker rats: early insulin resistance in muscles but normal sensitivity in white adipose tissue. *Diabetes*, 36: 626-631.
-  Perret B, Mabile L, Martinez L, Tercé F, Barbaras R and Collet X. (2002). Hepatic lipase. Structure/function relationship, synthesis and regulation. *J. Lipid Res.*, 43: 1163-1169.
-  Peterson RG, Shaw WN, Neel MA, Little LA and Eichberg J. (1990). Zucker diabetic fatty rat as model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *ILAR news*, 32: 16-19.
-  Petrescu I, Bojan O, Saied M, Barzu O, Schmidt F and Kühnle HF. (1978). Determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity with deoxyguanosine 5'-diphosphate as nucleotide substrate. *Analytical biochemistry*, 96: 279-281.



-  Pighin D, Karabatas L, Rossi A, Chicco A, Basabe JC, Lombardo YB. (2003). Fish oil affects pancreatic fat storage, pyruvate dehydrogenase complex activity and insulin secretion in rats fed a sucrose-rich diet. *J. of Nutrition*, 133: 4095-4101.
-  Podolin DA, Gayles EC, Wei Y, Thresher JS, Pagliassotti MJ. (1998). Menhaden oil prevents but does not reverse sucrose-induced insulin resistance in rats. *Am. J. Physiol.*, 274: R840-R848.
-  Popp-Snijders C, Schouten JA, Heine RJ, van der Meer J, van der Veen EA. (1987). Dietary supplementation of n-3 polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Res.*, 4:141-7.
-  Postic C and Girard J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.*, 118: 829-838.
-  Postic C, Dentin R, Girard J. (2004). Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab.*, 30: 398-408.
-  Qu S, Su D, Altomonte J, Kamagate A, He J, Perdomo G, Tse T, Jiang Y, Dong HH. (2007). PPAR- $\alpha$  mediates the hypolipidemic action of fibrates by antagonizing Fox O1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 292: E421-E434.
-  Radenne A, Akpa M, Martel C, Sawadogo S, Mauvoisin D and Mounier C. (2008). Hepatic regulation of fatty acid synthase by insulin and T<sub>3</sub>: evidence for T<sub>3</sub> genomic and nongenomic actions. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 295: E884-E894.
-  Rakhshandehroo M, Sanderson LM, Matilainen M, Strenstra R, Carlberg C, de Groot PJ, Muller M, Kersten S. (2007). Comprehensive analysis of PPAR- $\alpha$ -dependent regulation of hepatic lipid metabolism by expression profiling. In: *PPAR Research*, Hindawi Publishing Co. India, 1-13.
-  Randle PJ. (1986). Fuel selection in animals. *Biochem. Soc. Trans.*, 14(5): 799-806.
-  Reaven GM, Risser TR, Chen YD and Reaven EP. (1979). Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, non obese rats. *J. Lipid Res.*, 20: 371-378.



- Reaven GM. (1984). Diabetic hipertrigliceridemia in the rat: animal models simulating the clinical syndromes of impaired glucose tolerance, noninsulin-dependent diabetes and insulin-dependent diabetes. In: Shafir E, Renold AS, editors. Lessons from animal diabetes. London (UK): Libby; pp. 531-536.
- Reaven GM. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37: 1595-1607.
- Reaven GM. (2000). Diet and Syndrome X. *Curr. Atheroscler. Rep.*, 2: 503-507.
- Redgrave TG. (1970). Formation of cholesteryl ester-rich particulate lipid during metabolism of chylomicrons. *Journal of Clinical Investigation*, 49: 465-471.
- Ren B, Thelen AP, Peters JM, Gonzalez FJ, Jump DB. (1997). Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J. Biol. Chem.*, 272(43): 26827-26832.
- Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.*, 14: 2819-2830.
- Rivellese AA, Maffettone A, Lovine C, Di Marino L, Annuzzi G, Mancini M, Riccardi G. (1996). Long-term effects of fish oil on insulin resistance and plasma lipoproteins in NIDDM patients with hypertriglyceridemia. *Diabetes care*, 19(11): 1207-13.
- Roach PJ. (1986). Liver glycogen synthase. In *The Enzymes*, 17A: 499-539, 3rd ed. Boyer PD, Krebs EG, Eds. Orlando, FL, Academic Press.
- Rodgers J and Puigserver P. (2007). Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic situin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 12861-12866.
- Rösner S. (1974). Studies on an intravenous fat tolerance test: Methodological experimental and clinical experiences with Intralipid. *Acta Med. Scand. Suppl. I*, 564: 1-4.



-  Rossi A, Lombardo YB, Lacorte JM, Chicco A, Rouault C, Slama G, Rizkalla S. (2005). Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin resistant rats, *Am. J. Physiol.*, 289: R486-R494.
-  Rossi AS, Lombardo YB, Chicco AG. (2009). Lipogenic enzyme activities and glucose uptake in fat tissue of dyslipemic, insulin-resistant rats: Effects of fish oil. *Nutrition: En prensa.*
-  Russell JC, Amy RM. (1986). Early atherosclerotic lesions in a susceptible rat model: the LA/N corpulent rat. *Atherosclerosis*, 60: 119-129.
-  Ryu MH and Cha YS. (2003). The effects of a high-fat or high-sucrose diet on serum lipid profiles, hepatic acyl-CoA synthetase, carnitine palmitoyltransferase-I, and the acetyl-CoA carboxylase mRNA levels in rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36(3): 312-218.
-  Saltiel AR and Kahn CR. (2001). Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414: 799-806.
-  Sampath H and Ntambi JM. (2005). Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, 25:317-340.
-  Sanderson LM, Degenhardt T, Desvergne B, Muller M, Kersten S. (2008). The roles of PPAR- $\alpha$  and PPAR- $\beta/\delta$  in liver: Dietary versus endogenous fat sensor. *Chem. Phys. Lipids*, 154 (Suppl) S17.
-  Santamarina-Fojo S, González-Navarro H, Freeman L, Wagner E, Nong Z. (2004). Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24: 1750-1754.
-  Sassoon HF, Dror Y, Watson JJ and Johnson BC. (1973). Dietary regulation of liver glucose-6-phosphate dehydrogenase in the rat: starvation and dietary carbohydrate induction. *J. Nutr.*, 103: 321-335.
-  Schroeder F, Petresen AD, Huang H, Atshaves BP, Mc Intosh AL, Martin GG, Hostetler HA, Vespa A, Landrock D, Landrock KK, Payne HR, Kier AB. (2008). Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription. *Lipids*, 43: 1-17.



- Seboková E and Klimes I. (1997). Molecular and cellular determinants of triglyceride availability. *Annals New York Academy of Sciences*, 827: 200-214.
- Sevilla L, Guma A, Enrique-Tarancon G, Mora S, Muñoz P and Palacin M. (1997). Chronic high-fat feeding and middle-aging reduce in an additive fashion Glut 4 expression in skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235: 89-93.
- Shafir E, Ziv E and Mosthaf L. (1999). Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to  $\beta$ -cell failure in animal models. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 892: 223-246.
- Shih HM, Liu Z, Towle HC. (1995). Two CACGTG motifs with proper spacing dictate the carbohydrate regulation of hepatic gene transcription. *J. Biol. Chem.*, 270: 21991-21997.
- Simopoulos AP. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70 (Suppl): 560S-569S.
- Skurat AV, Dietrich AD and Roach PJ. (2000). Glycogen synthase sensitivity to insulin and glucose-6-phosphate is mediated by both  $\text{NH}_2$ - and  $\text{COOH}$ -terminal phosphorylation sites. *Diabetes*, 49: 1096-1100.
- Snedecor GWP, Cochran WG. (1967). *Statistical Methods applied to experimental in agriculture and biology*. (Ames, IA). University Press Iowa State. USA.
- Soria A, D'Alessandro ME and 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.
- Soria AM, Chicco A, D'Alessandro ME, Rossi A, Lombardo YB. (2002). Dietary fish oil reverse epididymal tissue adiposity, cell hypertrophy and insulin resistance in dyslipemic sucrose fed rat model. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 13: 209-218.
- Stefanovi-Racic M, Perdomo G, Mantell BS, Sipula IJ, Brown NF and O'Doherty RM. (2008). A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 294: E969-E977.



- Steinberg SJ, Kemp S, Braiterman LT and Watkins PA. (1999). Role of very-long-chain acyl-coenzyme A synthetase in X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann. Neurol.*, 46: 409-412.
- Stoeckman AK and Towle HC. (2002). The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *J. Biol. Chem.*, 277: 27029-27035.
- Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ and Kraegen EW (1986). Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am. L. Physiol.*, 251: E576-E583.
- Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW. (1991). Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and  $\omega$ -3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes*, 40: 280-289.
- Taniguchi CM, Ueki K and Kahn CR. (2005). Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J. Clin. Inv.*, 115(3): 718-727.
- Taouis M, Dagou C, Ster C, Durand G, Pinault M and Delarue J. (2002). N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. *Am. J. Physiol.*, 282: 664-671.
- Tobey TA, Mondon CE, Zavaroni I and Reaven GM. (1982). Mechanisms of insulin resistance of fructose-fed rats. *Metabolism*, 31: 608-612.
- Towle HC, Kaytor EN, Shih HM. (1997). Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu. Rev. Nutr.*, 17: 405-433.
- Vamecq J. (1990). Fluorometric assay of peroxisomal oxidase. *Anal. Biochem.*, 186: 340-349.
- Van den Berghe. (2004). How does blood glucose control with insulin save lives in intensive care?. *J. Clin. Invest.*, 114: 1187-1195.
- Van Schaftingen E, Lederer B, Bartrons R and Hers HG. (1982). A kinetic study of pyrophosphate: Fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers - application to a microassay of fructose-2,6-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.*, 129(1): 191-195.



-  Vaulont S, Vasseur-Cognet M and Kahn A. (2000). Glucose Regulation of Gene Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(41): 31555-31558.
-  Volpe JJ and Vagelos PR. (1976). Mechanisms and regulation of biosynthesis of saturated fatty acids. *Physiol. Rev.*, 56: 339-417.
-  Vrána A and Kazdova L. (1986). Effects of dietary sucrose or fructose on carbohydrate and lipid metabolism. *Prog. Biochem. Pharmacol.*, 21: 59-73.
-  Vrána A y Fábry P. (1983). Metabolic effects of high sucrose or fructose intake. *Wld. Rev. Nutr. Diet*, 42: 56-101.
-  Vrána A, Raulin J, Loriette C and Kazdová L. (1983). Basal pyruvate dehydrogenase activity in the liver, adipose tissue and brain of rats with fructose-induced hypertriglyceridemia. *Nutr. Rep. Int.*, 28: 1437-1444.
-  Wang CF, Hegsted DM. (1949). Normal blood volume, plasma volume and thiocyanate space in rats and their relation to body weight. *Am. J. Physiol.*, 156: 218-227.
-  Wassall SR, Stillwell W. (2008). Docosaxaenoic acid domains: The ultimate non-raft membrane domain. *Chem. Phys. Lipids*, 153: 57-63.
-  Wei Y, Bizeau ME, Pagliassotti MJ. (2004). A acute increase in fructose concentration increases hepatic glucose-6-phosphatase mRNA via mechanisms that are independent of glycogen synthase kinase-3 in rats. *J. Nutr.*, 134: 545-551.
-  White MF. (1998). The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Prog. Horm. Res.*, 53: 119-138.
-  Wise E and Ball EG. (1964). Malic Enzyme and Lipogenesis. *Proc. Nat. Acad. Science*, 52: 1255-1263.
-  Witters LA, Watts TD, Daniels DL and Evans JL. (1988). Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85: 5473-5477.
-  Wolfrum C, Borrmann CM, Borchers T, Spener F. (2001). Fatty acid and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$ - and  $\gamma$ - mediated gene



- expression via liver fatty acid-binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 98: 2323-2328.
-  Wollenberger A, Ristau O, Schoffa G. (1960). Eine einfache technik der extrem schnellen abkuhlung grober gewebsstucke. *Pflugers Arch. Ges. Physiol.*, 270: 339-412.
-  Xu J, Nakamura MT, Cho HP and Clarke SD. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 23577-23583.
-  Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K. (2001). A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 9116-9121.
-  Yoshikawa T, Ide T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Yatoh S, Kitamine T, Okazaki H, Tamura Y, Sekiya M, Takahashi A, Hasty AH, Sato R, Sone H, Osuga JI, Ishibashi S and Yamada N. (2003). Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Molecular Endocrinology*, 17: 1240-1254.
-  Youn JH, Kaslow HR and Bergman RN. (1987). Fructose effect to suppress hepatic glycogen degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(24): 11470-11477.
-  Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M and Olefsky JM. (2002). The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese and type 2 diabetic subjects. *Diabetes*, 51: 2968-2974.

## TRABAJOS CREATIVOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS Y PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.

### Trabajos Internacionales publicados:

2007. Lombardo YB, **Hein G**, Chicco AG. "Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dislipidemia, insulin resistance and adiposity". *Lipids*, 42: 427-437.

2008. Chicco AG, D'Alessandro ME, **Hein GJ**, Oliva ME, Lombardo YB. "Dietary chia seed (*Salvia hispanica* L.) rich in alpha-linolenic acid improves adiposity and normalizes hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats". *British Journal of Nutrition*, 101: 41-50.

2009. **Hein GJ**, Montanaro M, Bernasconi A, Pellón-Maison M, Finarelli G, Chicco AG, Lombardo YB, Brenner RR. "Nuclear receptors and hepatic lipidogenic enzymes response to a dyslipidemic sucrose rich diet and its reversion by fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids". *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*. (Aceptado para su publicación).

2009. **Hein GJ**, Chicco AG, Lombardo YB. "Key enzymes of glucose metabolism and insulin signaling in the liver of dyslipemic rats: Effects of dietary fish oil". (En preparación).

### Trabajos Nacionales publicados:

2008. **Hein GJ**, Lombardo YB, Chicco AG. "Efectos de los n-3 PUFAs de origen marino sobre algunas enzimas hepáticas claves involucradas en el metabolismo lipídico en ratas dislipémicas". *Revista de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FABICIB)*, 12: 117-128.

## ASISTENCIA Y/O PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS.

### Congresos Internacionales:

2006. 24th International Symposium on Diabetes and Nutrition. "Polyunsaturated fatty acids (n-3) from vegetable source improve lipid metabolism in dyslipemic insulin resistant rats". Bernard MC, **Hein G**, Chicco A, Lombardo YB. Lloyd's Baia Hotel Salerno, Italia. Abstract N° 33 pág. 66.

2008. 49th International Conference on the Bioscience of Lipids. "Effect of fish oil on the unsaturated fatty acid metabolism in dyslipidemic sucrose fed rats". Brenner RR, Montanaro M, Bernasconi M, Pellón-Maison M, Finarelli G, **Hein G**, Chicco A, Lombardo

YB. Maastricht, Holanda. Chemistry and Physics of Lipids, Volume 154, Supplement 1, Page S44.

**2009.** 27th International Symposium on Diabetes and Nutrition. "Nuclear receptors and lipogenic enzyme response to a dyslipemic sucrose rich diet and its reversion by n-3 polyunsaturated fatty acids". Lombardo YB, **Hein G**, Bernasconi AM, Montanaro MA, Pellón-Maison M, Finarelli G, Chicco A, Brenner RR. Potsdam, Alemania. Abstract N° 24, pág. 34.

#### **Congresos Nacionales:**

**2006.** XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. "Key enzymes of lipid and carbohydrate metabolism in liver of dyslipemic rats: effect of fish oil". **Hein G**, Chicco A, Lombardo YB. SAIB, Trabajo LI-P12 pág. 90.

**2006.** XV Congreso Argentino de Diabetes. "Acción de los ácidos grasos (AG) n-3 de origen vegetal en un modelo experimental de dislipemia e intolerancia a la glucosa". Chicco A, Bernard MC, **Hein G**, D'Alessandro ME, Lombardo YB. Mendoza, Argentina. Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes, vol. 40(63), Trabajo 12, pág. 100.

**2006.** XV Congreso Argentino de Diabetes. "Dislipidemia y resistencia insulínica experimental: rol de enzimas claves involucradas en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono a nivel hepático". **Hein G**, Chicco A, Lombardo YB. Mendoza, Argentina. Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes, vol. 40(63), Trabajo 39, pág. 111.

**2007.** LII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica-LV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología-Reunión de la Sociedad Argentina de Fisiología. "Efecto de los n-3 PUFAs de origen marino sobre el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono". **Hein G**, Chicco A, Lombardo YB. Mar Del Plata, Argentina. Medicina, vol. 67 (Supl. II). Trabajo 210 pág. 124.

**2008.** LIII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica-Reunión de la Sociedad Argentina de Fisiología. "Efecto de los ácidos grasos polietilénicos n-3 sobre el metabolismo de los ácidos grasos no saturados y la dislipidemia en ratas alimentadas con una dieta rica en sacarosa". **Hein G**, Chicco A, Lombardo YB, Brenner RR, Montanaro M, Bernasconi M, Pellón-Maison M, Finarelli G. Mar Del Plata, Argentina. Medicina, vol. 68 (Supl. II), Trabajo 243 pág. 125.