

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE BIOQUIMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Laboratorio de Estudios de Enfermedades Metabólicas  
Relacionadas con la Nutrición**

**TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“TEJIDO ADIPOSO: Rol de las Adipocitoquinas (leptina, TNF- $\alpha$  y adiponectina) en la adiposidad visceral. Relación con los ácidos grasos no esterificados plasmáticos, PPARs, resistencia insulínica y estrés oxidativo en un modelo experimental de dislipemia. Efecto de los ácidos grasos n-3”**

Tesista: **Lic. Dante A. Selenscig**

Director de Tesis: **Dra. Yolanda B. de Lombardo**

Co-director de Tesis: **Dra. Adriana G. Chicco**

**AÑO 2010**

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Laboratorio 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 del CONICET, y la codirección de la Dra. Adriana G. Chicco, Profesora Asociada de la Cátedra de Química Biológica e Investigadora Independiente de CONICET.

Deseo dedicar unas breves, aunque sentidas líneas de agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que sin sus aportes, sugerencias y apoyo no hubiera sido posible la conclusión del presente trabajo de Tesis.

En primer lugar, quisiera agradecer a las Doctoras Yolanda Bolzón de Lombardo y Adriana G. Chicco, principalmente por haber creído en mí y haberme apoyado de manera totalmente incondicional desde el principio, y también por su esfuerzo, consejos, supervisión y dedicación en largas horas de reuniones.

En lo institucional quisiera mostrar mi agradecimiento a la Universidad Nacional del Litoral, en particular a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por otorgarme la posibilidad de realizar mi formación de Post-Grado en la carrera del Doctorado en Ciencias Biológicas. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y tecnológica (ANPCyT), por otorgarme la beca que me permitió finalizar mis estudios de Post-Grado y por posibilitarme la realización de esta tesis a través de sus subsidios (PICT 05-38157 OC-AR).

A mis compañeros y amigos de trabajo, con los que comparto las mismas experiencias y nos ponemos el hombro cada vez que se necesita, por su apoyo y ánimo a lo largo de estos años de estudio.

A mis padres que siempre me alentaron a superarme. Al resto de la familia y amigos que con tanta paciencia me han soportado durante todo este tiempo.

Especialmente quisiera darle las gracias a mi esposa, Valeria, compañera y amiga, por su apoyo incondicional, comprensión y constante estímulo que me ha ayudado a finalizar esta etapa de mi vida y por brindarme tantas alegrías, en especial, Leonardo.

A todos ellos, desde los más profundo de mi corazón mi más sincero agradecimiento.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN.....</b>	1
<b>SUMMARY.....</b>	3
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	5
1. Fisiología del tejido adiposo.....	6
2. Tejido adiposo como órgano endocrino.....	10
2.1. Leptina.....	10
2.2. Adiponectina.....	13
2.3. Factor de Necrosis Tumoral - $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....	15
3. Receptor activador de la proliferación peroxisomal (PPARs).....	19
4. Proteína desacoplante (UCPs).....	20
5. Tejido adiposo y estrés oxidativo.....	21
6. Modelos experimentales.....	25
<b>OBJETIVOS.....</b>	31
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	33
1. Animales y dietas.....	33
2. Obtención de muestras de sangre y tejidos.....	39
3. Procedimientos experimentales: Métodos analíticos.....	40
3.1. Determinaciones séricas.....	40
3.1.1. Glucosa.....	40
3.1.2. Triglicéridos.....	40
3.1.3. Ácidos grasos no esterificados (AGNE).....	40
3.1.4. Colesterol total.....	40
3.1.5. Insulina.....	41
3.1.6. Adiponectina y leptina.....	41
3.2. Estudios <i>in vivo</i> .....	41
3.2.1. Capacidad de utilización de la glucosa por los tejidos <i>in vivo</i> . Clamp euglucémica-hiperinsulinémica.....	41
3.3. Determinaciones en tejido adiposo epididimal.....	42
3.3.1. Aislamiento de adipocitos.....	42

3.3.2. Determinación del diámetro, área y volumen promedio de los adipocitos aislados.....	43
3.3.3. Determinación del contenido lipídico celular medio.....	44
3.3.4. Determinación de la celularidad del tejido adiposo epididimal.....	45
3.3.5. Determinación del número de adipocitos en la suspensión celular.....	46
3.3.6. Determinación del glicerol liberado en adipocitos aislados.....	46
3.3.7. Determinación de la secreción de leptina en adipocitos aislados.....	47
3.3.8. Determinación del contenido de leptina.....	48
3.3.9. Determinación del contenido del factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....	48
3.3.10. Análisis de masa proteica por la técnica Western blot.....	48
3.3.10.1. Receptor activador de la proliferación peroxisomal $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ ).....	48
3.3.10.2. Proteína desacoplante 2 (UCP2).....	49
3.3.11. Determinación de actividades enzimáticas.....	51
4.3.11.1. Xantino oxidoreductasa.....	51
4.3.11.2. Catalasa.....	52
4.3.11.3. Glutation peroxidasa.....	53
4.3.11.4. Glutation reductasa.....	54
3.3.12. Determinación de la peroxidación de lípidos.....	54
3.3.13. Determinación del contenido de glutacion.....	55
4. Reactivos utilizados.....	56
5. Análisis estadístico de los datos experimentales.....	57
<b>RESULTADOS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>58</b>
<b>PARTE I. Caracterización del modelo.....</b>	<b>58</b>
1.1. Incremento de peso corporal e ingesta calórica.....	58
1.2. Metabolitos, niveles de insulina y leptina plasmáticos y sensibilidad insulínica periférica global.....	60

1.3. Peso del tejido adiposo, volumen, número de células y contenido de triglicéridos.....	60
1.4. Histograma de distribución de diámetros celulares.....	63
<b>PARTE II A. Adipocitoquinas y adiposidad visceral.....</b>	<b>65</b>
2.1. Efecto de la insulina, isoproterenol y ácido palmítico en la secreción de leptina en adipocitos aislados.....	66
2.2. Correlación entre el glicerol basal liberado y la leptina liberada.....	68
2.3. Correlación entre el contenido de leptina y el peso del tejido adiposo epididimal.....	69
2.4. Correlación entre los niveles de adiponectina plasmática y sensibilidad insulínica periférica global.....	71
2.5. Correlación entre los niveles plasmáticos de AGNE y adiponectina.....	72
2.6. Contenido del factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) en tejido adiposo epididimal.....	73
2.7. Correlación entre el contenido de TNF- $\alpha$ en tejido adiposo epididimal y el volumen celular de adipocitos aislados.....	74
<b>PARTE II B.....</b>	<b>75</b>
2.8. Determinación de la expresión de la masa proteica del receptor activador de la proliferación peroxisomal $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ ) en tejido adiposo epididimal.....	75
2.9. Determinación de la expresión de la masa proteica de la proteína desacoplante 2 (UCP2) en tejido adiposo epididimal.....	77
<b>PARTE II C. Marcadores del estrés oxidativo.....</b>	<b>79</b>
2.10. Enzima oxidante xantino oxidoreductasa.....	80
2.11. Determinación de las actividades enzimáticas de la catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.....	81
2.12. Correlación entre el contenido de glutatión total y el estado redox del glutatión.....	83
2.13. Determinación de la peroxidación de lípidos en tejido adiposo (TBARS).....	85

<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>86</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>103</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>104</b>
<b>PUBLICACIONES, PRESENTACIONES A CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS.....</b>	<b>134</b>

## TABLAS Y FIGURAS:

### Tablas

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Composición de las dietas experimentales (% en peso y % en kJ).....	35
<b>Tabla 2.</b> Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de las diferentes fuentes de grasa.....	37
<b>Tabla 3.</b> Composición de ácidos grasos (% p/p) de las diferentes dietas administradas a los animales durante todo el periodo experimental.....	38
<b>Tabla 4.</b> Peso corporal, ingesta calórica y ganancia de peso de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	59
<b>Tabla 5.</b> Niveles de metabolitos, insulina y leptina plasmática y sensibilidad insulínica periférica global (VIG) en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	61
<b>Tabla 6.</b> Peso del tejido adiposo, volumen, número de células y contenido de triglicéridos en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	62

## **Figuras**

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Metabolismo lipídico en los adipocitos .....	9
<b>Figura 2.</b> Factores secretados por el tejido adiposo.....	11
<b>Figura 3.</b> Vías de producción y eliminación de los intermediarios reactivos del oxígeno.....	23
<b>Figura 4.</b> Diseño experimental.....	34
<b>Figura 5.</b> Histograma de distribución promedio de los diámetros de adipocitos epididimales aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	63
<b>Figura 6.</b> Efectos de la insulina, isoproterenol y ácido palmítico sobre la liberación de leptina en adipocitos aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	67
<b>Figura 7.</b> Correlación entre leptina basal liberada y glicerol basal liberado en adipocitos aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	68
<b>Figura 8.</b> Correlación entre el contenido de leptina en tejido adiposo epididimal y el peso del tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	70
<b>Figura 9.</b> Correlación entre los niveles plasmáticos de adiponectina y la sensibilidad insulínica periférica global de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	71
<b>Figura 10.</b> Correlación entre los niveles plasmáticos de adiponectina y los AGNEs de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	72
<b>Figura 11.</b> Contenido de TNF- $\alpha$ en el tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	73
<b>Figura 12.</b> Correlación entre el contenido de TNF- $\alpha$ en tejido adiposo epididimal y el volumen celular de los adipocitos de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	74

<b>Figura 13.</b> Expresión de la masa proteica del PPAR- $\gamma$ en el tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	76
<b>Figura 14.</b> Expresión de la masa proteica de la UCP2 en el tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	78
<b>Figura 15.</b> Actividad enzimática de la xantino oxidoreductasa ( <b>A</b> ) y xantino oxidasa ( <b>B</b> ) en tejido adiposo epididimal de de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	80
<b>Figura 16.</b> Actividades enzimáticas de la catalasa ( <b>A</b> ), glutatión peroxidasa ( <b>B</b> ) y glutatión reductasa ( <b>C</b> ) en tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	82
<b>Figura 17.</b> Correlación entre el contenido de glutatión total y el estado redox del glutatión en tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	84

## **ABREVIATURAS:**

AGNE: Ácidos grasos no esterificados

AHB: aceite de hígado de bacalao

DC: Dieta control

DRS: Dieta rica en sacarosa

DRS+AHB: Dieta rica en sacarosa+AHB

GLUT4: Proteína transportadora de glucosa 4

GPx: Glutation peroxidasa

GR: Glutation reductasa

GSH: Glutation reducido

GSSG: Glutation oxidado

IL-6: Interleuquina 6

IRS-1 y -2: Substrato receptor de insulina 1 y 2

LPL: Lipoproteína lipasa

MDA: malondialdehído

PI3K: Fosfoinositol-3-quinasa

PKA: Proteína quinasa A

PPAR- $\gamma$ : Receptor- $\gamma$  activador de la proliferación peroxisomal

PUFAs: Ácidos grasos polinosaturados

RI: Resistencia insulínica

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SOD: Superóxido dismutasa

SREBP1: Proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides

TBARS: Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico

Tg: Triglicérido

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

UCP2: Proteína desacoplante 2

VIG: Velocidad de infusión de glucosa

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

XD: Xantino deshidrogenasa

XO: Xantino oxidasa

XOR: Xantino oxido reductasa

# **RESUMEN / SUMMARY**



## **RESUMEN:**

La obesidad es considerada como uno de los factores de riesgo en la constelación de anomalías que caracterizan al Síndrome metabólico, el cual constituye uno de los mayores desafíos de Salud Pública y de sumo interés en lo que atañe a su prevención y tratamiento. La compleja patogénesis de las anomalías involucradas en el Síndrome metabólico no está completamente dilucidada, sin embargo la interacción entre factores genéticos y ambientales (estilo de vida y composición de la dieta) contribuyen indudablemente a su mayor incidencia.

Además de su función tradicional de depósito de energía y principal proveedor de ácidos grasos a la circulación, el tejido adiposo es un importante órgano secretor, liberando un gran número de adipocitoquinas. Desde una perspectiva “adipocéntrica” se postula que la expansión del tejido adiposo es un factor importante en el desarrollo del Síndrome metabólico como nexo entre obesidad y resistencia insulínica. Además, la obesidad se asocia con estrés oxidativo pudiendo producir un desbalance entre los niveles de las especies reactivas del oxígeno.

De lo expuesto, el tejido adiposo es un tejido clave para esclarecer algunos mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de dislipemia, resistencia insulínica y diabetes tipo 2 presentes en el Síndrome metabólico. En este contexto el modelo experimental “no genético” de dislipemia, insulino resistencia, hipoleptinemia y adiposidad visceral inducido por una ingesta crónica de una dieta rica en sacarosa (DRS) fue utilizado en el transcurso de esta tesis para desarrollar los siguientes objetivos generales -1. Evaluar aspectos bioquímicos y funcionales del tejido adiposo que podrían jugar un rol clave en la dislipemia e insulino resistencia inducida por una dieta rica en sacarosa: mecanismos que relacionan AGNEs, adipocitoquinas, receptor activador de la proliferación peroxisomal- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), adiposidad visceral y algunos aspectos del estrés oxidativo. -2. Si el disturbio del metabolismo lipídico a nivel plasmático (incremento de AGNEs y triglicéridos) y tisulares es uno de los factores más importante involucrado en las alteraciones antes mencionadas, evaluamos la posibilidad de mejorar y/o revertir dichas anomalías utilizando cambios nutricionales adecuados: ácidos grasos n-3 de origen marino.

Los resultados del presente trabajo señalan en animales alimentados con DRS: 1) Menor secreción de leptina basal y bajo el estímulo de la insulina (*adipocitos aislados*).



2) Menores niveles plasmáticos de adiponectina que se correlacionan con la alterada sensibilidad insulínica y mayor disponibilidad de AGNE plasmáticos. En *tejido adiposo epididimal*: 3) Mayor contenido de leptina y del TNF- $\alpha$ . 4) Menor expresión de la masa proteica del PPAR- $\gamma$  e incremento de la expresión de la masa proteica de la UCP2. 5) Un incremento significativo de la actividad oxidante asociado a una significativa disminución de las actividades de las enzimas antioxidantes. Esto se acompañó de un importante incremento del contenido de glutatión total y un menor estado redox del glutatión, lo que demuestra la disfuncionalidad del tejido adiposo y su rol clave en la adiposidad visceral en este modelo experimental de dislipemia y resistencia insulínica. 6) La sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria -aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao (AHB) rico en ácidos grasos n-3 20:5 y 22:6- que normalizó la dislipemia y la sensibilidad insulínica fue capaz de mejorar o revertir las anomalías antes mencionadas.

El efecto hipolipemiante del AHB que normaliza la sensibilidad insulínica periférica global, decrece la lipólisis intracelular, incrementando la captación de glucosa del tejido adiposo, podría contribuir a la normalización de la secreción de leptina y los niveles plasmáticos de adiponectina en los animales alimentados con DRS. Además, la administración de n-3 PUFAs redujo significativamente el tamaño de los adipocitos los cuales son mas sensibles a la acción insulínica, normalizó la masa proteica del PPAR- $\gamma$  y el contenido de otra importante adipocitoquina involucrada en el desarrollo de la adiposidad visceral como lo es el TNF- $\alpha$ . Por otro lado los AGNEs están implicados en la activación del estrés oxidativo, no solo desacoplando la fosforilación oxidativa (mayor expresión de la masa proteica de la UCP2) sino también por deteriorar las defensas antioxidantes. El efecto del AHB dietario sobre los niveles de AGNEs redujo también a su turno el estrés oxidativo normalizando la disfuncionalidad del tejido adiposo.

De todo lo expuesto nuestros hallazgos sugieren que la manipulación de las grasas dietarias podrían jugar un rol clave en el tratamiento de los desórdenes lipídicos, modificando de manera favorable las anomalías metabólicas antes descriptas. Si bien nuestros resultados no pueden ser extrapolados en forma directa al humano, el modelo experimental de DRS constituye una excelente herramienta para estudiar diferentes aspectos metabólicos y funcionales del Síndrome metabólico en general y en particular del tejido adiposo.



## **SUMMARY:**

Obesity is considered one of the risk factors in the constellation of abnormalities that characterize the metabolic syndrome, which is one of the greatest challenges of Public Health and of great interest as regards prevention and treatment. The pathogenesis complex of the anomalies involved in the metabolic syndrome is not entirely understood, but the interaction between genetic and environmental factors (lifestyle and diet composition) contributes to their increased incidence.

Further to the traditional role of energy deposition and provider of fatty acids into the circulation, adipose tissue is an important secretory organ, releasing a large number of adipocytokines. From an adipocentric view, it is suggested that the expansion of adipose tissue is an important factor in the development of metabolic syndrome as a link between obesity and insulin resistance. In addition, obesity is associated with oxidative stress which can generate an imbalance between the levels of reactive oxygen species.

According to the foregoing, adipose tissue is a key tissue to clarify some pathophysiological mechanisms involved in the development of dyslipemia, insulin resistance and type 2 diabetes which are present in metabolic syndrome. In this context the experimental model nongenetic of dyslipemia, insulin resistance, hypoleptinemia and visceral adiposity induced by chronic intake of sucrose rich diet (SRD) was used on this work to investigate the following objectives: 1. Evaluate biochemical and functional aspects of adipose tissue which may play a key role in the insulin resistance and dyslipemia induced by a sucrose rich diet: Mechanisms related to FFA, adipocytokines, peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), visceral adiposity and some aspects of oxidative stress. 2. If the disturbance of lipid metabolism in plasma (increased FFA and triglycerides) and tissue is one of the most important factors involved in the alterations mentioned above, we evaluated the possibility of improving and / or reversing these abnormalities using appropriate nutritional changes: fatty acids n-3 of marine origin.

The results of this study show in animals fed SRD: 1) Leptin release was reduced both basally and under the stimulus of insulin (*adipocytes isolated*). 2) Lower plasma adiponectin levels were correlated with impaired insulin sensitivity and plasma FFA levels. In *adipose tissue*: 3) Greater contents of leptin and TNF- $\alpha$ . 4) Reduced PPAR- $\gamma$  protein expression and increased UCP2 protein expression. 5) A significant increase in the oxidant activity and a



decrease in the the antioxidant activities. This was accompanied by a significant increase in total glutathione levels and lower redox state of glutathione, demonstrating a dysfunctional adipose tissue and its key role in visceral adiposity in this experimental model of dyslipidemia and insulin resistance. 6) Partial substitution of the source of dietary fat, corn oil by cod liver oil rich in n-3 fatty acids 20:5 and 22:6, that normalize the dyslipidemia and peripheral insulin sensitivity, was able to improve or reverse the anomalies mentioned above.

The hypolipemiant effect of cod liver oil, that normalize total peripheral insulin sensitivity, that decreases intracellular lipolysis increasing glucose uptake in adipose tissue, may contribute to the normalization of the secretion of leptin and adiponectin plasma levels in SRD-fed animals. Besides, the administration of n-3 PUFAs reduced the adipocytes size that are more sensitive to insulin action, normalized PPAR- $\gamma$  protein expression and content of another important adipocytokine involved in the development of visceral adiposity such as TNF- $\alpha$ . On the other hand, FFA are involved in the activation of oxidative stress, not only by uncoupling oxidative phosphorylation (increased UCP2 protein expression) but also by impairing antioxidant defenses. The effect of dietary cod liver oil on the levels of FFA also in turn reduced oxidative stress by normalizing the dysfunction of adipose tissue.

Our findings suggest that manipulation of dietary fats may play a key role in the treatment of lipid disorders, modifying favorably the metabolic abnormalities previously described. Although the results obtained cannot be directly extrapolated to humans, the SRD model is an excellent tool for studying different metabolic and functional aspects of the metabolic syndrome in general, and adipose tissue, in particular.

# **INTRODUCCIÓN**



## **INTRODUCCION:**

La masa del tejido adiposo está regulada por un equilibrio dinámico entre la ingesta dietaria y el gasto energético. La ruptura de este balance lleva a obesidad, una enfermedad multifactorial que involucra un incremento en la masa del tejido adiposo. Los datos más recientes del National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2005–2006 indican que la prevalencia de obesidad fue del 33-35% entre los adultos de los Estados Unidos (Ogden y col. 2007). En otra encuesta reciente del NHANES basada en los años combinados del 2003 al 2006, el 16% de los niños y adolescentes de 2 a 19 años fueron obesos (Ogden y col., 2008). En Europa, la compilación de varias encuestas realizadas desde el año 2000 y el uso de medidas antropométricas directas muestran que la prevalencia de obesidad varió del 15 al 30% en los hombres y del 11 al 34% en las mujeres, con una variación geográfica considerable (siendo mayores las tasas en Europa Central, Oriental y Sur) (Berghofer y col., 2008). Factores como la urbanización y la dieta desequilibrada, asociado con la susceptibilidad genética han permitido la emergencia del fenotipo obeso.

La obesidad es considerada como uno de los factores de riesgo junto a la resistencia insulínica (RI), alterada homeostasis de la glucosa, diabetes tipo 2, dislipemia e hipertensión, en la constelación de anormalidades que caracterizan al Síndrome metabólico (Medina-Gomes y col., 2007). Dicho Síndrome es uno de los mayores desafíos de la Salud Pública (Alberti y col., 2005). En el estudio de corazón realizado en San Antonio (Texas) sobre aproximadamente 2600 personas (con un rango de edad entre 25 y 64 años), 25 al 40% de los participantes tenían Síndrome metabólico (Lorenzo y col., 2007); mientras que en un estudio europeo (Italia), Mannucci y col. (2007) observaron que el Síndrome metabólico estaba presente en el 30% de los participantes (3000) y con un rango de edad de aproximadamente 55 años.

La diabetes tipo 2 y la obesidad son entidades consideradas por la Organización Mundial de la Salud como epidémicas, siendo unos de los problemas actuales de salud mundial. En nuestro país existe un 6 a 7% de prevalencia de diabetes, porcentaje que duplica el de hace 10 años (Gagliardino, 2000), siendo la diabetes no insulino dependiente tipo 2 la más frecuente. En la actualidad se ha visto incrementada su incidencia en edades aún muy tempranas (menos de 30 años).



La compleja patogénesis de las anomalías involucradas en el Síndrome metabólico no está completamente dilucidada, sin embargo la interacción entre factores genéticos y ambientales: estilo de vida (sedentarismo) y composición de la dieta (excesivo consumo de bebidas conteniendo sacarosa y alimentos ricos en carbohidratos simples y grasas saturadas) contribuyen indudablemente a la mayor incidencia de dicho Síndrome.

En este contexto el tejido adiposo es hoy reconocido como un tejido clave en la RI y por ende en el Síndrome metabólico relacionado a ella (Arner, 2003). Además de su función como depósito de energía y principal proveedor de ácidos grasos para su utilización por otros tejidos, el tejido adiposo es un importante órgano secretor, liberando a la circulación péptidos semejantes a hormonas que afectan al metabolismo sistémico y a la propia célula adiposa. Desde una perspectiva “adipocéntrica” se postula que la expansión del tejido adiposo es un factor importante en el desarrollo del Síndrome metabólico como nexo entre obesidad y resistencia insulínica. Entre los mecanismos involucrados en este proceso se ha propuesto que: un exceso del combustible energético que rebasa la capacidad oxidativa/almacenamiento, alteración de la producción de citoquinas por adipocitos y macrófagos, estrés oxidativo, inflamación crónica, entre otros, contribuiría a la desregulación funcional del tejido adiposo (Medina-Gomez y col., 2007). En su conjunto los aspectos mencionados convierten al tejido adiposo en un tejido clave para esclarecer algunos mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de algunas anomalías presentes en el Síndrome metabólico.

## **1. FISIOLÓGÍA DEL TEJIDO ADIPOSEO:**

Durante muchos años se consideró que el tejido adiposo tenía un papel importante sobre los lípidos corporales totales y la homeostasis energética, siendo definido como el principal sitio para el almacenaje de energía. Con el incremento de la ingesta alimentaria y/o la disminución del gasto de energía, el exceso de la misma se deposita de manera eficiente en el tejido adiposo en forma de triglicéridos neutros. Sin embargo, cuando la alimentación es escasa y/o se incrementan los requerimientos energéticos, las reservas de lípidos son liberadas para proporcionar el combustible energético.



Los triglicéridos provenientes de la dieta (exógenos) ingresan a la circulación plasmática desde la linfa en la forma de quilomicrones. El hígado sintetiza y secreta la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), la cual transporta los triglicéridos endógenos sintetizados desde el hígado hasta los tejidos extrahepáticos.

La enzima lipoproteína lipasa (LPL) presente en el endotelio capilar de los tejidos extrahepáticos, entre ellos el tejido adiposo hidroliza los triglicéridos de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL y quilomicrones). Estas lipoproteínas se unen a la enzima por la cual tienen gran afinidad debido a la presencia de apolipoproteína CII (Apo CII) como parte integral de estas lipoproteínas, liberando progresivamente ácidos grasos libres (AGL) y glicerol. Los ácidos grasos libres son captados por la célula adiposa a través del CD36 y transportados al interior de la misma por la proteína aP2. Luego, por acción de la acetil-CoA sintasa son transformados en el acil derivado, acil-CoA. Los ácidos grasos son principalmente reesterificados y almacenados como triglicéridos, mientras que el glicerol es captado principalmente por las células hepáticas.

En el tejido adiposo, la glucosa es transportada al interior de la célula por el transportador de glucosa GLUT4. El transporte de glucosa tiene la particularidad de estar estimulado por la insulina. Una vez en el citoplasma, la glucosa es metabolizada hasta piruvato. El piruvato ingresa a la mitocondria y por descarboxilación oxidativa irreversible (a través del complejo de la piruvato deshidrogenasa – PDHc) se transforma en acetil-CoA. El acetil-CoA sale de la mitocondria hacia el citosol como citrato (condensación con el oxalacetato), donde es desdoblado a oxalacetato y acetil-CoA. El acetil-CoA es transformado a malonil-CoA por descarboxilación irreversible catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACC). Luego, el malonil-CoA es elongado por el complejo de la sintetasa de ácidos grasos (FAS) para formar acil-CoA. A partir de este y el glicerol-3-P se sintetizan los triglicéridos formando parte del pool de triglicéridos. En esta vía metabólica intervienen glicerol-3-P aciltransferasa, ácido lisofosfatídico acil transferasa y diacil-glicerol acil transferasa, esta última enzima es clave en el control de este proceso (Proscura e Ignatieva, 2002).

Los adipocitos contienen enzimas capaces de escindir los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos (triglicérido lipasa (ATGL) y lipasa hormona sensible (HSL)). Los ácidos grasos producto de esta lipólisis son transportados por la sangre unidos a la albúmina y pueden ser utilizados por tejidos no adiposos (hígado, músculo esquelético, cardiaco, etc) oxidándose o reesterificándose según las condiciones nutricionales (**Figura 1**).



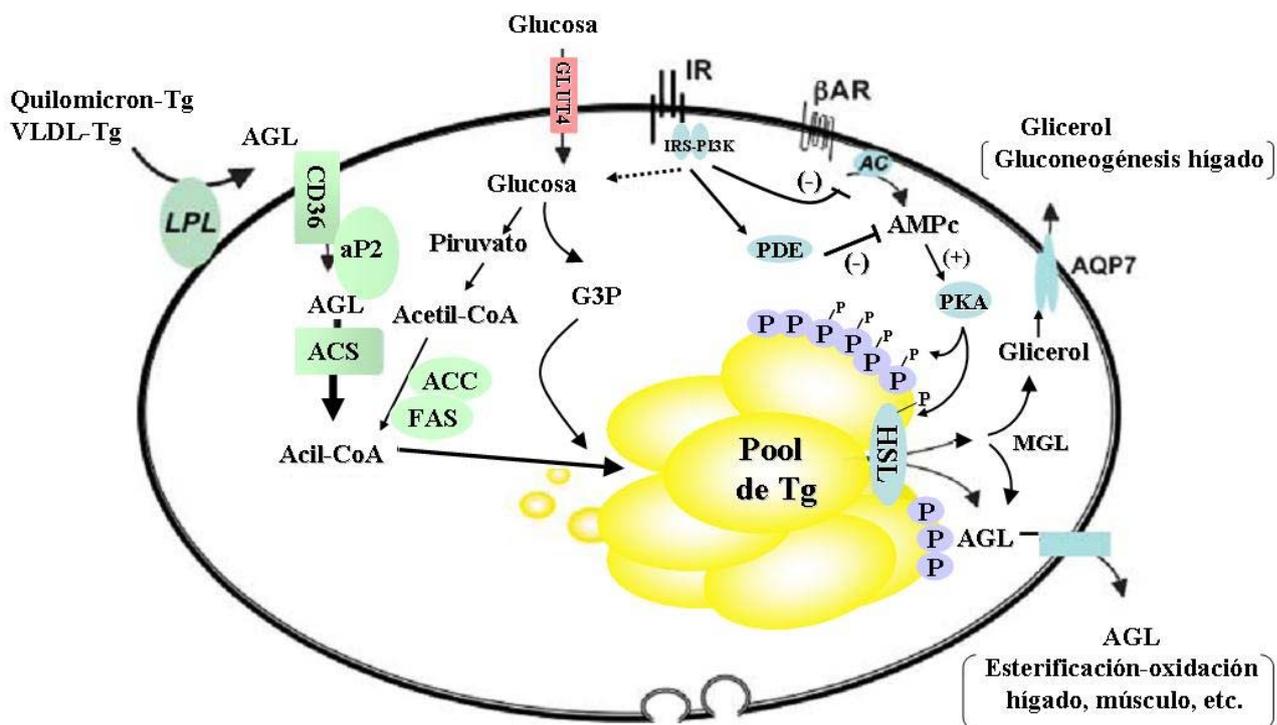
La activación de los receptores  $\beta$  adrenérgicos lleva a la generación de AMPc por estimulación de la enzima adenilato ciclasa de membrana. Esta vía está mediada por la proteína G estimuladora (Gs) la cual está positivamente ligada a la enzima. El AMPc activa la proteína quinasa A (PKA) la cual media a través de fosforilaciones la activación de la HSL. Al contrario, la estimulación del receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico promueve la inhibición de la adenilato ciclasa por medio de la proteína G inhibitoria (Gi), reduciendo el contenido intracelular de AMPc e inhibiendo la lipólisis (Lafontan y Berlan, 1995).

La HSL fosforilada se mueve desde el citosol hacia la superficie de la gota grasa de la célula adiposa. La fosforilación de la familia de proteínas localizadas en la superficie de la gota grasa, las perilipinas, es también requerida antes de que la HSL pueda catalizar la hidrólisis de los triglicéridos. Las perilipinas no fosforiladas crean una barrera entre la HSL y los lípidos, previniendo la lipólisis, mientras que la fosforilación de las perilipinas por la PKA permite a la HSL acceder a la superficie de la gota grasa. La acción de la HSL sobre los triglicéridos presenta especificidad por los ésteres unidos en posición 1 y 3 (Yeaman, 1990). También se debe considerar la acción ATGL en los procesos de hidrólisis de triglicéridos. La hidrólisis de los monoglicéridos remanentes para dar un glicerol y un ácido graso, ocurre por la acción de la monoglicéridolipasa (MGL), que no se encuentra bajo control hormonal y cuya abundancia en la célula es suficiente para evitar la acumulación de productos intermediarios de la lipólisis (Horowitz, 2003). El glicerol generado luego de la degradación metabólica de los triglicéridos es transportado a través de la membrana plasmática por medio de la acuoporina 7 (AQP7) (MacDougald y Burant, 2005).

Entre las hormonas que favorecen la velocidad de lipólisis de los depósitos de triglicéridos se encuentran: adrenalina, noradrenalina, glucagón, hormona corticotrófica (ACTH), hormona melanocito estimulante (MSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), etc. La insulina es la única hormona que antagoniza con la acción de las hormonas lipolíticas. La insulina inhibe la lipólisis a nivel de la adenilato ciclasa inhibiendo la formación de AMPc y a nivel de la fosfodiesterasa (PDE) estimulando la degradación del AMPc, esto se realiza a través del mediador de efectos metabólicos dependientes de la insulina, la fosfoinositol-3-quinasa (PI3-K), que activa por fosforilación a la PDE (Langin y col., 1996).

Dadas sus funciones, no es de sorprender que el tejido adiposo esté exquisitamente diseñado para responder a los cambios agudos de las señales nutricionales. En realidad, a nivel molecular y bioquímico, los adipocitos están equipados con la maquinaria necesaria para responder a la estimulación hormonal, por ejemplo, el adipocito es sensible a la insulina (la cual estimula la captación de glucosa y la lipogénesis e inhibe la lipólisis) y está sujeto a la regulación adrenérgica (la cual estimula la lipólisis) (Sethi y Vidal-Puig, 2007).

**Figura 1.** Metabolismo lipídico en los adipocitos.<sup>1</sup>



<sup>1</sup> En la figura se muestran las principales vías metabólicas de los lípidos y de la glucosa en el tejido adiposo. Además se señalan algunas enzimas, transportadores y receptores importantes de estas vías metabólicas descritas en mayor detalle en las páginas 7 y 8 del texto. AC: adenilato ciclasa, ACS: acil-CoA sintasa, ACC: acetil-CoA carboxilasa, AGL: ácido graso libre, AMPc: adenosinmonofosfato cíclico, AR: receptor adrenérgico, FAS: sintetasa de ácidos grasos, G3P: glicerol 3 fosfato, HSL: lipasa hormona sensible, IR: receptor de la insulina, IRS: substrato del receptor de insulina, LPL: lipoproteína lipasa, MGL: monoglicérido lipasa, PDE: fosfodiesterasa, PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa, PKA, proteína quinasa A, P: perilipina, AQP7: acuoporina 7 (Modificado de Sethi y Vidal-Puig, 2007).



## 2. TEJIDO ADIPOSO COMO ORGANO ENDOCRINO:

Además de lo descripto anteriormente, el tejido adiposo actúa como un órgano endocrino liberador de hormonas produciendo numerosas sustancias, llamadas adipocitoquinas, que incluyen varias citoquinas, hormonas y factores de crecimiento. Más de 100 de estos factores secretados han sido identificados y algunos ejemplos de los mismos están resumidos en la **Figura 2**. A través de estas sustancias el tejido adiposo no solo influye sobre la propia biología adipocitaria sino también sobre la regulación de la homeostasis energética, sensibilidad insulínica y metabolismo de lípidos y carbohidratos (Havel, 2004).

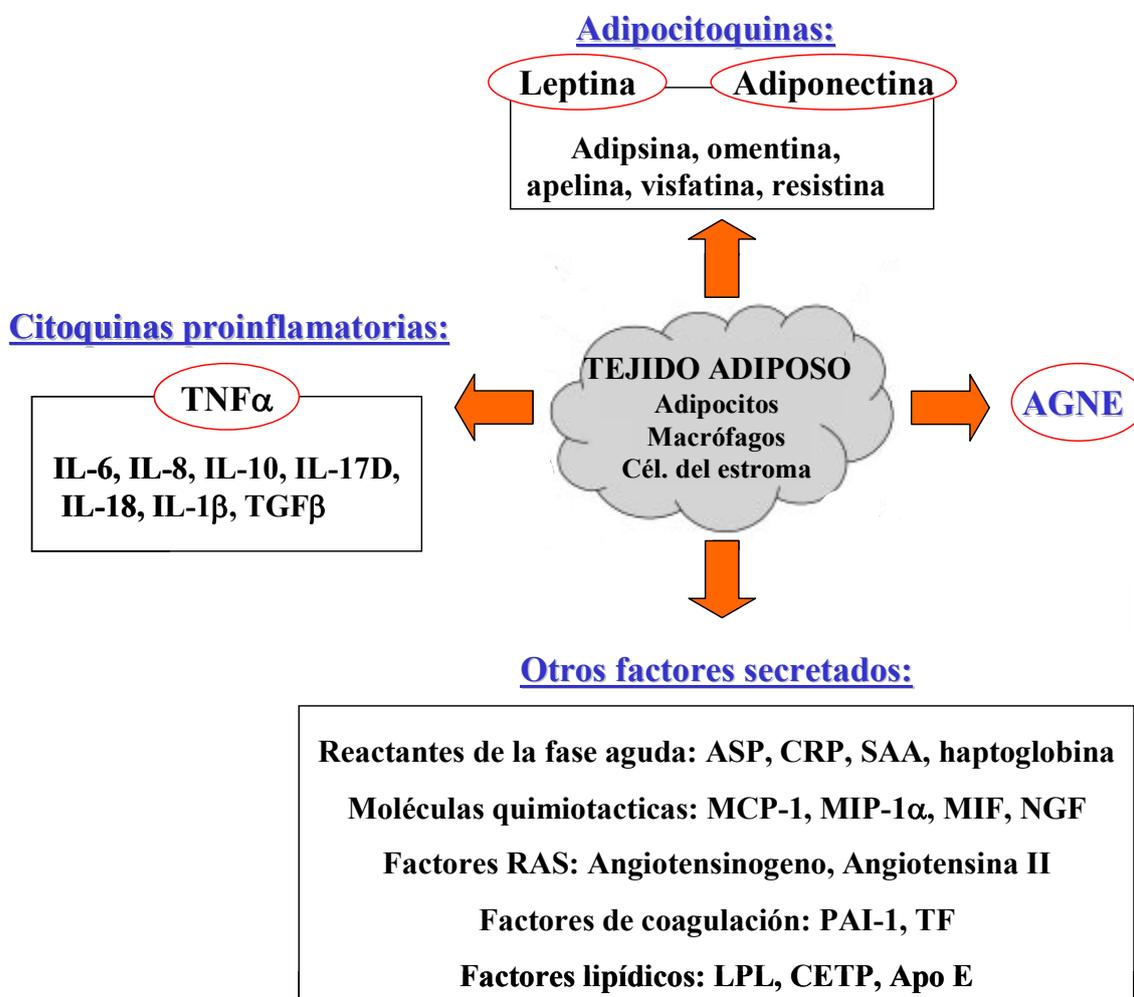
### 2.1. Leptina

La leptina es una hormona peptídica de 16 kDa, codificada por el gen *ob*, que es producida y secretada por los adipocitos. La impresión inicial fue que la leptina (del griego leptos, delgado) era una señal para el cerebro para inhibir la ingesta de alimentos y disminuir el peso (Zhang y col., 1994). Este concepto fue impulsado en parte por la observación de que los seres humanos y roedores que carecen de leptina funcional manifiestan un mayor apetito y obesidad. Además, el tratamiento con leptina revertía en animales de experimentación, por ejemplo, estas anomalías (Maury y Brichard, 2010). Sin embargo, la noción de la leptina como una hormona anti-obesidad fue puesta en duda debido a que la obesidad se asocia típicamente con niveles altos de leptina y resistencia a la leptina (Ahima, 2008). Los niveles circulantes de leptina están asociados con la masa del tejido adiposo y también reflejan cambios inmediatos en el estado nutricional ya que disminuyen, poco después del comienzo del ayuno (Becker y col., 1995).

La leptina ejerce sus acciones biológicas uniéndose a sus receptores. Estos son codificados por el gen diabetes (*db*) y pertenecen a la superfamilia de receptores de citoquina clase 1. El splicing alternativo del gen *db* da origen a las 6 isoformas de los receptores: la forma soluble Ob-Re, la cual carece de dominio citoplasmático; cuatro formas con cortos dominios citoplasmáticos (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd y Ob-Rf), y la forma Ob-Rb, la cual se encuentra en casi todos los tejidos y parece ser la única forma capaz de transducir la señal de la leptina (Lago y col., 2007). La principal ruta por la cual el receptor Ob-Rb transmite la

señal extracelular parece ser la vía JAK-STAT (Frühbeck, 2006), la cual involucra la fosforilación de tirosinas de JAK2 en el dominio citoplasmático del receptor.

**Figura 2.** Factores secretados por el tejido adiposo.<sup>1</sup>



<sup>1</sup> En la figura se observan los factores más importantes generados por el tejido adiposo: adipocitoquinas, citoquinas proinflamatorias, AGNE (ácidos grasos no esterificados) y otros factores, descritos en detalle en las páginas 10 a 18 del texto. ASP: proteína estimuladora de acilación, CRP: proteína C reactiva, CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol, IL: interleuquina, LPL: lipoproteína lipasa, MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos-1, MIF: factor inhibidor de la migración macrofágica, MIP-1 $\alpha$ : proteína inflamatoria de macrófago 1 $\alpha$ , NGF: factor de crecimiento neuronal, PAI-1: inhibidor del activador plasminógeno, RAS: sistema renina angiotensina, SAA: suero amiloide A, TGF $\beta$ : factor de crecimiento transformante  $\beta$ , TF: factor tisular (Modificado de Sharma y Staels, 2007).



Se ha observado que la expresión y secreción de leptina está modulada por numerosos factores, por ejemplo: incrementa por la insulina, glucocorticoides, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), estrógenos; y disminuye por actividad  $\beta$ -adrenérgica, andrógenos y agonistas del receptor activador de la proliferación peroxisomal  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) (Vettor y col., 2005).

La respuesta de la insulina a la ingesta es el principal mediador de los cambios en la producción de leptina observadas durante el ayuno/restricción de energía y realimentación y de la variación diurna de los niveles circulantes de leptina (Havel, 2001). Trabajos realizados en adipocitos aislados y en estudios clínicos en seres humanos apoyan la idea de que la insulina aumenta indirectamente la producción de leptina a nivel transcripcional, a través de sus efectos estimulatorios sobre la utilización y el metabolismo oxidativo de la glucosa en adipocitos (Havel, 2004).

La leptina juega un rol importante en la ingesta dietaria, el gasto energético y la adiposidad, así como en los sistemas inmune y endocrino (Maury y Brichard, 2010). Además, tiene acciones en el cerebro (el hipotálamo, la corteza y zonas límbicas) y en varios de los tejidos periféricos (células  $\alpha$  y  $\beta$  del páncreas, hígado y sistema inmunológico), sin embargo, la acción central de la leptina en el cerebro y, en particular, el hipotálamo ha sido mejor caracterizada en lo que respecta a la homeostasis de la energía (Badman y Flier, 2007).

La leptina de la periferia es transportada al cerebro, se une a su receptor en el hipotálamo, y activa JAK-STAT3, llevando a la supresión de "péptidos orexígenos" y el aumento de "péptidos anorexígenos", en consecuencia, afectando la ingesta de alimentos. La disminución de la leptina que se produce con rapidez en respuesta al ayuno también evoca profundos cambios en el balance energético y hormonal a través del hipotálamo. Niveles bajos de leptina inducen sobrealimentación y suprimen el gasto de energía, las hormonas tiroideas y reproductivas y la inmunidad. Las adaptaciones mediadas por los bajos niveles leptina pueden haber evolucionado como una protección contra la carencia de alimentos, al limitar el uso de energía y mejorar su almacenamiento (Ahima, 2008).

La leptina limita el depósito de grasa en el tejido adiposo protegiendo de la lipotoxicidad (Kahn y col., 2005; Unger, 2002). La leptina estimula la oxidación de los ácidos grasos (Muoio y col., 1997; Minokoshi y col., 2002) y la captación de glucosa (Haque y col., 1999; Kamohara y col., 1997). Estos efectos metabólicos de la leptina se encuentran en parte mediados por la activación del eje hipotálamo-sistema nervioso simpático (Buettner y col., 2008; Minokoshi y col., 2002). Muchos de estos efectos metabólicos tienen lugar demasiado



rápido para ser atribuido a los cambios transcripcionales (señalización JAK-STAT) e involucran la activación de la señalización de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) como fue descrito en el músculo/hígado por Kahn y col. (2005). La leptina puede tener efectos autócrinos y parácrinos en el metabolismo del adipocito: la incubación de adipocitos de ratón con leptina estimula la lipólisis de triglicéridos intracelulares, dicho efecto no fue observado en ratones *db/db* carentes de receptores de leptina y la sobreexpresión de leptina en adipocitos reduce la expresión de la acetil-CoA carboxilasa. La leptina también reduce la expresión de la proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides 1c (SREBP1c) en tejido adiposo, lo que contribuye a inhibir la lipogénesis en este tejido (Yu y Ginsberg, 2005).

Consistente con el rol pleiotropico de la leptina, su participación en algunas de las principales vías de señalización ha sido observada, incluyendo aquellas que involucran los sustratos receptores de insulina, fosfoinosítidos 3-quinasa, la proteína quinasa B, la proteína quinasa C, la quinasa regulada por señales extracelulares, las proteínas quinasas activadas por mitógenos, la fosfodiesterasa, la fosfolipasa C y el óxido nítrico (Frühbeck, 2006).

## 2.2. Adiponectina

La adiponectina es una proteína de 30 kDa producida abundantemente por el tejido adiposo (Maeda y col., 1996; Scherer y col., 1995). Está presente en el flujo sanguíneo en tres formas principales: trímero, hexámero y como adiponectina de alto peso molecular (HMW) (12 a 18 subunidades) (Kadowaki y col., 2006). En contraste con la mayoría de las adipocitoquinas, la adiponectina circulante se correlaciona negativamente con el índice de masa corporal (Brichard y col., 2003) y disminuye en las personas obesas, en pacientes con diabetes tipo 2 o con enfermedades cardiovasculares (Ouchi y Walsh, 2007). La disminución de los niveles de adiponectina plasmática en la diabetes y obesidad se relaciona con el desarrollo de RI (Statnick y col., 2000). Más aún, Yamauchi y col. (2001) observaron que un decrecimiento de la expresión de adiponectina se correlaciona con RI en roedores. Los mecanismos subyacentes que inducen un decrecimiento de la producción de adiponectina involucran un entorno hormonal anormal (Delparte y col., 2002; Halleux y col., 2001.), estrés oxidativo (Furukawa y col., 2004) y un estado pro-inflamatorio (Bruun y col., 2003), condiciones que prevalecen en la obesidad y el Síndrome metabólico.



Los principales receptores de la adiponectina *in vivo* son AdipoR1 y AdipoR2. Ellos pertenecen a la familia de receptores que contienen siete dominios transmembrana, pero son estructural y funcionalmente distintos del grupo de los receptores acoplados a proteínas G. AdipoR1 se expresa abundantemente en el músculo y está estrechamente vinculado a la activación de la vía AMPK que regula la inhibición de la gluconeogénesis junto con una mayor oxidación de ácidos grasos. AdipoR2 se expresa en músculo y en hígado (Yamauchi y col., 2003), y parece asociarse con la activación de la vía del activador de la proliferación peroxisomal alfa (PPAR- $\alpha$ ), la inhibición de la inflamación y el estrés oxidativo (Capeau, 2007; Yamauchi y col., 2007).

Aunque el mecanismo que regula la producción de adiponectina no ha sido completamente caracterizado, se sabe que el TNF- $\alpha$ , la interleuquina 6 (IL-6) y los agonistas  $\beta$  adrenérgicos reprimen su síntesis (Havel, 2004). Por otro lado, la expresión celular parece encontrarse bajo el control del PPAR- $\gamma$  y esto se relacionaría con la sensibilidad insulínica (Pellmé y col., 2003). Más aún, la adiponectina es estimulada por tiazolidinedionas, agonistas de los PPAR- $\gamma$ , contribuyendo al incremento de la sensibilidad insulínica (Havel, 2004).

En humanos con diabetes y severa resistencia a la insulina como consecuencia de mutaciones dominante-negativas que inactivan los receptores del PPAR- $\gamma$  se observan muy bajos niveles circulantes de adiponectina (Barroso y col., 1999; Combs y col., 2002). La expresión génica de la adiponectina es reducida por el TNF- $\alpha$ , IL-6, agonistas  $\beta$  adrenérgicos o glucocorticoides. Los efectos de estas adipocitoquinas, catecolaminas y glucocorticoides en inducir resistencia a la insulina podrían estar mediados, en parte, por sus efectos en disminuir la producción de adiponectina (para revisión ver Havel, 2004).

Entre las funciones más importantes, la adiponectina tiene propiedades antiinflamatorias y antiaterogénicas ya que disminuye la síntesis de moléculas de adhesión endoteliales e inhibe la respuesta inflamatoria, exhibiendo efectos beneficiosos sobre los trastornos cardiovasculares y metabólicos como la aterosclerosis y la resistencia a la insulina. Esta adipocitoquina se encuentra involucrada en el metabolismo de hidratos de carbono y de lípidos sensibilizando los tejidos a la acción de la insulina (Maury y Brichard, 2010). Al respecto, la adiponectina tiene la capacidad de aumentar la acción de la insulina sobre hepatocitos aislados, lo que favorece la disminución de la producción hepática de glucosa



(Scherer, 2003), y por otro lado, estimula la oxidación de los ácidos grasos en el músculo esquelético disminuyendo la glucemia y los niveles plasmáticos de ácidos grasos y triglicéridos (Havel, 2004). Además, los niveles de adiponectina se correlacionan negativamente con el incremento de la lipólisis y la liberación de ácidos grasos (Fasshauer y col., 2001).

Recientemente se ha postulado que la adiponectina de HMW en lugar de la adiponectina total podría ser el biomarcador más importante del Síndrome metabólico. Además, se ha demostrado que la adiponectina reduce la producción y actividad del TNF- $\alpha$  e inhibe la producción de IL-6, acompañado por una inducción de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y antagonista del receptor de IL-1. La inhibición del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) por la adiponectina podría explicar al menos en parte estos efectos (Fantuzzi, 2005).

### **2.3. Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

El TNF- $\alpha$  es sintetizado como una proteína transmembrana de 26 kDa que sufre la degradación por una metaloproteinasa que libera a la circulación la molécula soluble de TNF- $\alpha$  de 17 kDa (Kriegler y col., 1988). Los adipocitos aislados y diferenciados son capaces de producir TNF- $\alpha$  y aunque el tejido adiposo está compuesto de una variedad de tipos celulares incluyendo adipocitos, células del estroma, células inmunes y células endoteliales vasculares, todas capaces de producir citoquinas, los adipocitos son la fuente predominante de TNF- $\alpha$  (Ruan y col., 2003).

La mayoría de los efectos del TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo están mediados por el receptor de TNF- $\alpha$  1 (TNFR1) y la subsecuente activación de varias vías de transducción (Cawthorn y Sethi, 2008). Dos vías de señalización de factores de transcripción han sido vinculadas a los efectos pro-inflamatorios de la obesidad y RI: el NF- $\kappa$ B y la vía de c-Jun NH2-terminal quinasa (JNK). Estas vías se activan por muchos de los mismos estímulos pro-inflamatorios incluyendo citoquinas como el TNF- $\alpha$ , que además de activar al NF- $\kappa$ B también regula los productos de NF- $\kappa$ B (Shoelson y col., 2007).

Al presente, el TNF- $\alpha$  es reconocido como una citoquina reguladora multifuncional, implicada en: inflamación, supervivencia y apoptosis celular, citotoxicidad, inducción de la



producción de otras citoquinas tales como IL-1 e IL-6, y RI. Con respecto a esta última, Sabio y col. (2008) y Shoelson y col. (2007) demostraron en modelos animales que los mecanismos moleculares que subyacen a la RI inducida por el TNF- $\alpha$  involucran la fosforilación de la serina mediada por JNK del receptor sustrato de insulina (IRS-1), el cual inhibe la normal fosforilación de la tirosina del IRS-1 y la señalización en la cadena de señales de la insulina.

El TNF- $\alpha$  es un marcador inflamatorio asociado con adiposidad y factores de riesgo cardiovasculares, producido por los macrófagos dentro del tejido adiposo y por los adipocitos mismos; es estimulado por el estrés del retículo endoplasmático y la respuesta a proteínas mal plegadas (Ferranti y Mozaffarian, 2008). Debido a que el TNF- $\alpha$  es secretado por los adipocitos, se piensa que proporciona un enlace molecular clave entre obesidad y un estado inflamatorio crónico que en última instancia conduce a la patofisiología del tejido adiposo (Kim y col., 2006). El TNF- $\alpha$  ha sido también implicado como un importante factor autócrino/parácrino que estimula la lipólisis induciendo la liberación de ácidos grasos libres desde el tejido adiposo (Ruan y col., 2003). Sethi y Hotamisligil (1999) han demostrado que el TNF- $\alpha$  disminuye la expresión de los transportadores de ácidos grasos en adipocitos decreciendo la captación de los mismos desde la circulación y contribuyendo a la dislipemia. El efecto neto del TNF- $\alpha$  sería el de disminuir la lipogénesis (captación de ácidos grasos libres y síntesis de triglicéridos) e incrementar la lipólisis. También se ha observado que regula la síntesis de leptina, el inhibidor del activador de plasminógeno -1 (PAI-1), la  $\alpha$ P2 y el GLUT4 (Arner, 2003).

Dentro de otras adipocitoquinas que cumplen funciones en el tejido adiposo podemos mencionar la **interleuquina 6 (IL-6)**, la cual es una citoquina proinflamatoria de 22 a 27 kDa con varios grados de glicosilación. En contraste con el TNF- $\alpha$ , la IL-6 circula a niveles relativamente elevados y un tercio de su concentración plasmática es originada en el tejido adiposo. Sin embargo, la mayor parte de la IL-6 derivada del tejido adiposo proviene de las células de la fracción del estroma vascular (Galic y col., 2010).

La IL-6 incrementa los niveles de proteína C reactiva y de moléculas de adhesión que median los procesos inflamatorios, y se la ha relacionado con las alteraciones presentes en el Síndrome metabólico (Das, 2002), debido a que los niveles plasmáticos como su expresión en tejido adiposo blanco se encuentran elevados en obesidad y RI (Mohamed-Ali y col., 1997; Bastard y col., 2000; Vozarova y col., 2001). Su producción y su concentración en plasma han



sido correlacionadas positivamente con los depósitos grasos. Se ha observado que un incremento en plasma estimula la secreción de triglicéridos por el hígado y por lo tanto contribuye con la hipertrigliceridemia asociada a obesidad visceral. El TNF- $\alpha$ , los corticoides, la leptina y las catecolaminas inducen la expresión de IL-6 en los adipocitos (Frühbeck y col., 2001).

La IL-6 inhibe la producción de adiponectina (Yu y Ginsberg, 2005); regula positivamente la producción del factor de crecimiento endotelial vascular en los adipocitos viscerales y subcutáneos *in vitro* y en el ratón, apoyando así la angiogénesis durante el crecimiento del tejido adiposo (Hajer y col., 2008).

Otras citoquinas proinflamatorias secretadas por el tejido adiposo incluyen la IL-8, la IL-10, la IL-17D, la IL-18, la IL-1 $\beta$  y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ).

Entre los reactantes de la fase aguda secretados por el tejido adiposo se encuentra la **proteína estimuladora de la acilación (ASP)**, la cual es la única hormona producida a partir del factor C del complemento por medio de una interacción que requiere el factor B y la adipsina (factor D) lo que resulta en la formación del derivado C3 (C3adesArg) también conocido como ASP. La ASP secretada por el adipocito puede tener un rol importante en la regulación del metabolismo de los lípidos en dicho tejido. La ASP actúa localmente en el tejido adiposo, donde estimula la captación de glucosa, incrementa la actividad de la diacilglicerol aciltransferasa, e inhibe la actividad de la HSL. Estas acciones de ASP incrementan la eficiencia de la síntesis de triglicéridos y su almacenamiento en los adipocitos (Havel, 2004).

Los niveles plasmáticos de ASP están elevados en sujetos obesos en proporción a la adiposidad y sus concentraciones plasmáticas disminuyen durante el ayuno y después de la pérdida de peso (Havel, 2004).

Otros reactantes de la fase aguda liberados por el tejido adiposo son: la **proteína C reactiva (CRP)**, el **suero amiloide A (SAA)** y la **haptoglobina**.

El **inhibidor del activador de plasminógeno -1 (PAI-1)** es producido por varios tejidos, incluyendo el tejido adiposo. En la grasa humana, las células del estroma en lugar de



los adipocitos contribuyen a la producción de PAI-1 e *in vitro* el tejido adiposo visceral secreta más PAI-1 que el tejido adiposo subcutáneo. Este inhibidor de serina proteasas (serpinas) es un factor importante en el mantenimiento de la homeostasis vascular dado que inhibe la activación del plasminógeno y su incremento lleva a una hipofibrinólisis y a un estado pro-trombótico (Maury y Brichard, 2010). El trabajo de Alessi y col. (2007) sugiere que el PAI-1 podría contribuir directamente a las complicaciones de la obesidad, incluyendo la RI, aterotrombosis y diabetes tipo 2, y posiblemente a la hipertrofia del tejido adiposo. También se ha observado una correlación positiva de sus niveles plasmáticos con la distribución abdominal del tejido adiposo en hombres y mujeres y con la RI (Frühbeck y col., 2001).

La síntesis y los niveles circulantes de PAI-1 se encuentran incrementados en la obesidad (Trayhurn y Wood, 2004). La insulina, el TGF- $\beta$  y el TNF- $\alpha$  estimulan su secreción (Frühbeck y col., 2001). Otro factor de coagulación liberado por el tejido adiposo es el **factor tisular (TF)**.

El **angiotensinógeno** es el precursor de la angiotensina II y se sintetiza primariamente en el hígado aunque se expresa también en varios tejidos, incluyendo el adiposo. Este último es considerado como la mayor fuente extrahepática de angiotensinógeno. Se ha sugerido que tiene influencia en la diferenciación adipocitaria induciendo a las células grasas a producir prostaciclina. La expresión de angiotensinógeno en tejido adiposo está incrementada en obesidad y es regulada por el estado nutricional. La expresión génica y la secreción de esta adipocitoquina disminuyen durante el ayuno. El angiotensinógeno podría jugar un papel en el incremento del flujo sanguíneo local del tejido adiposo y por lo tanto aumentar la disponibilidad de sustratos para la reesterificación de ácidos grasos. Así, afectando el flujo sanguíneo y promoviendo la diferenciación preadipocitaria, está capacitado para regular el tamaño del adipocito en respuesta a señales nutricionales (Frühbeck y col., 2001).

Además el tejido adiposo secreta distintos factores lipídicos que son importantes reguladores del metabolismo de lipoproteínas como son la **lipoproteína lipasa (LPL)**, **apolipoproteína E (apo E)** y **proteína transportadora de esteres de colesterol (CETP)**.

### **3. RECEPTOR ACTIVADOR DE LA PROLIFERACIÓN PEROXISOMAL (PPARs):**

Se han descrito tres isoformas de PPAR: PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta$  y PPAR- $\gamma$ , que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (Ferré, 2004). El PPAR- $\alpha$  se expresa mayoritariamente en el hígado y regula genes implicados en la oxidación mitocondrial, peroxisomal y microsomal de los ácidos grasos (Desvergne y col., 2006). El PPAR- $\beta$  se expresa principalmente en el cerebro, tejido adiposo y piel, y regula genes involucrados en la función cerebral, la diferenciación epidérmica y la implantación uterina entre otros, y el PPAR- $\gamma$  (isoformas PPAR- $\gamma$ 1 y PPAR- $\gamma$ 2) es requerido para la normal diferenciación del adipocito involucrado en funciones fisiológicas críticas tales como: adipogénesis y el metabolismo de lípidos y glucosa.

El PPAR- $\gamma$  estimula la captación de los ácidos grasos, la proteína transportadora de ácidos grasos, la LPL, la proteína ligadora de ácidos grasos (FABP) y la acil-CoA sintasa, y la esterificación de los triglicéridos en una acción concertada con otro factor de transcripción SREBP -isoforma SREBP-1c- que regula la lipogénesis para el llenado de las gotas lipídicas (Evans y col., 2004).

Luego de la diferenciación terminal, el gen del PPAR- $\gamma$  se expresa de manera constitutiva para mantener el fenotipo de adipocito maduro. Más aún, Torre-Villalvazo y col. (2008) demostraron una significativa reducción de la expresión génica del PPAR- $\gamma$  en tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta rica en grasa comparado con ratas alimentadas con dieta control. En consecuencia, los adipocitos, aunque incrementan su contenido lipídico tienen una capacidad significativamente reducida para esterificar ácidos grasos en triglicéridos, incrementando así la liberación de ácidos grasos a la circulación y la captación de los mismos por tejidos no adiposos tales como el hígado y páncreas.

Además, el PPAR- $\gamma$  del tejido adiposo parece ser un mediador esencial para el mantenimiento de la sensibilidad insulínica global; protegiendo al tejido no adiposo de la sobrecarga de lípidos y garantizando la apropiada producción de adipocitoquinas por los adipocitos, como son la leptina y adiponectina (Sharma y Staels, 2007).

Se ha sugerido que el PPAR- $\gamma$  podría modular directamente la vía de transducción de la señal de la insulina en el tejido adiposo (vía PI3K). Una segunda vía, la cual involucra el producto del proto-oncogén c-CBL y CAP (proteína asociada a c-CBL), actúan en conjunto



para incrementar este proceso. Varios grupos han demostrado que la activación del PPAR- $\gamma$  en el tejido adiposo puede influenciar la señalización de la insulina a distintos niveles de este camino (por ejemplo, a través de la regulación positiva del IRS-1 y IRS-2, la subunidad p85 de la PI3K y la CAP) lo cual en su conjunto podría predecir el aumento de la actividad del GLUT4 (para revisión ver Gurnell, 2007).

#### **4. PROTEÍNA DESACOPLANTE (UCPs):**

Las proteínas desacoplates que se encuentran en la membrana mitocondrial interna son capaces de desacoplar la oxidación de los combustibles energéticos por medio de la cadena transportadora de electrones de la síntesis de ATP, disipando la energía como calor e influenciando la eficiencia metabólica. Existen distintas proteínas desacoplates, la UCP1 se expresa casi exclusivamente en el tejido adiposo marrón y juega un rol importante en la termogénesis inducida por el frío y cambios nutricionales (Boss y col., 2000). La UCP2 que se expresa en diferentes tejidos incluyendo el adiposo y la UCP3 mayoritariamente expresada en el músculo esquelético cumple un rol potencial en la regulación del gasto energético relacionándose con la obesidad y a la diabetes tipo 2 (Fleury y col., 1997; Vidal-Puig, 1997).

La UCP2 está codificada por un gen nuclear, pero es expresada exclusivamente en la mitocondria (Ostrowski y col., 2004). Estudios recientes han implicado a la UCP2 en la regulación del transporte y metabolismo de ácidos grasos libres, control de la formación de los intermediarios reactivos del oxígeno e inhibición de la secreción de insulina (De Souza y col., 2007).

En el tejido adiposo, las propiedades de la UCP2 parece que se adaptan a la regulación del metabolismo energético. Se ha sugerido que la UCP2 podría regular la homeostasis energética particularmente bajo condiciones donde los AGNE se hallan incrementados como en el caso de la diabetes y el ayuno (Saleh y col., 2002). Una característica importante de la UCP2 es que su expresión es modulada por la dieta y no es regulada por el sistema nervioso simpático. Específicamente, la expresión génica de la UCP2 incrementa por el consumo de grasa dietaria (Surwit y col., 1998).



## 5. TEJIDO ADIPOSO Y ESTRÉS OXIDATIVO:

La obesidad se asocia con estrés oxidativo a nivel mitocondrial. El estrés oxidativo puede ser definido como un desbalance entre los niveles de las especies reactivas del oxígeno y la reducción de sustancias que protegen contra el daño de los radicales libres y los peróxidos. En presencia de adiposidad, hiperglucemia y elevados niveles de ácidos grasos el procesamiento del exceso de ácidos grasos por las mitocondrias causa desacoplamiento mitocondrial y liberación de especies reactivas del oxígeno (Ferranti y Mozaffarian, 2008).

### Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Los ROS son el producto de muchos procesos oxidativos: bioquímicos y fisiológicos, ellos pueden ser producidos por la acción de las enzimas xantino oxidasa, NADPH oxidasa, lipooxigenasas, desacoplamiento de la sintasa de óxido nítrico y la cadena respiratoria mitocondrial. Los ROS son moléculas altamente reactivas que, aunque ellas puedan dañar químicamente componentes celulares, participan en el mantenimiento de la homeostasis redox celular y en las vías de transducción de señales (Drogue, 2002). Las células poseen sistemas de detoxificación que las protegen de los efectos nocivos de los ROS, tanto en el citoplasma como en la mitocondria (Matés y col., 1999; Nordberg y Arner, 2001).

El anión superóxido es formado por la reducción univalente del oxígeno molecular en estado triplete. Este proceso es mediado por enzimas tales como la NADPH oxidasa y la xantino oxidasa o no enzimáticamente por compuestos redox reactivos tales como la semi-ubiquinona de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (**Figura 3**) (Drogue, 2002).

En el tejido adiposo el incremento en la producción de ROS se puede deber en gran medida a la acción de la **xantino oxidoreductasa (XOR)**, cuya expresión es mucho más elevada en comparación con otros tejidos (Cheung y col., 2007). Esta enzima cataliza los 2 últimos pasos en la degradación de las purinas llevando a la producción de ácido úrico como producto final. En mamíferos esta enzima tiene dos formas que varían en su selectividad al sustrato oxidativo; la xantina deshidrogenada, la cual es  $\text{NAD}^+$  dependiente y la xantina oxidasa (XO) la cual posee un oxígeno como aceptor electrónico y libera un gran número de ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$  y  $\cdot\text{O}_2^-$ ) como productos de su acción catalítica (Marti y col., 2001). Numerosas ROS y especies reactivas del nitrógeno son sintetizadas con ambas formas de la enzima, pero particularmente con la forma XO. Además, la síntesis de un antioxidante (el

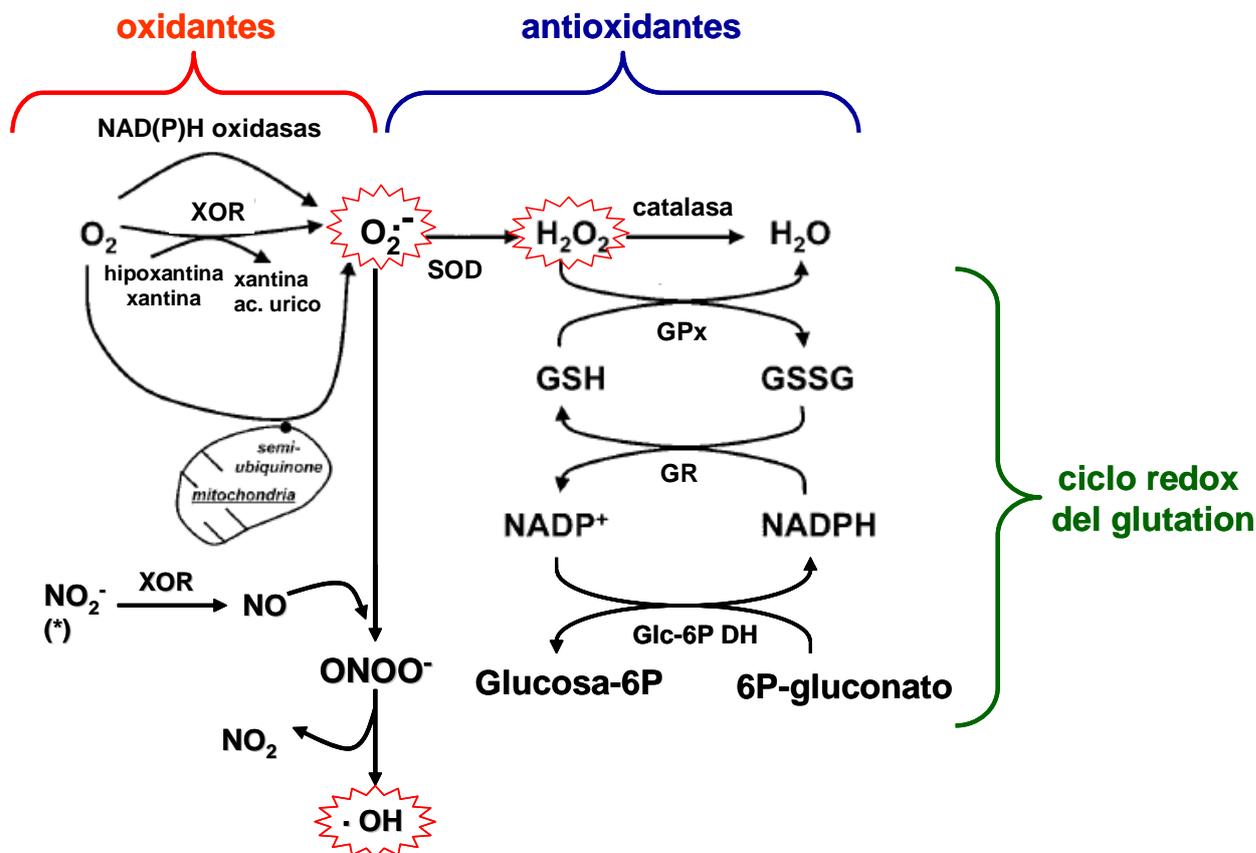


ácido úrico) y numerosos radicales libres (ROS y especies reactivas del nitrógeno) hacen a la XOR un importante regulador protector del potencial redox celular.

Numerosos patógenos, citoquinas, así como muchas formas de daño tisular, pueden rápidamente inducir la expresión adicional de la XOR. Aunque la xantino deshidrogenasa es la forma predominante de XOR encontrada en células y tejidos normales, la XO parece tener un rol más importante en las células y tejidos dañados. Varios estímulos inducen la conversión de la xantino deshidrogenasa a la forma XO, resultando en una síntesis intensiva de ROS y especies reactivas del nitrógeno (Vorbach y col., 2003). Al respecto, se ha visto que la actividad de la XO se encuentra incrementada en el plasma e hígado de animales diabéticos y ha sido implicada en la producción de radicales libres durante la diabetes, basado en la disminución observada en el estrés oxidativo de pacientes diabéticos durante el tratamiento de los mismos con un inhibidor de la XO, el allopurinol (Descio y col., 2002).

Por otro lado, en diabetes el elevado flujo de ácidos grasos libres incrementa la producción mitocondrial de ROS, las cuales interfieren con la señalización de la insulina (Subauste y Burant, 2007). Además, la producción de ROS se incrementa selectivamente en el tejido adiposo del ratón obeso, acompañado por una incrementada expresión de la NADPH oxidasa (otra enzima importante en la producción de estas sustancias reactivas del oxígeno) y una disminuida expresión de las enzimas antioxidantes. En adipocitos cultivados, los elevados niveles de ácidos grasos incrementan el estrés oxidativo por medio de la activación de NADPH oxidasa, la cual causa una desregulada producción de adipocitoquinas. En el ratón obeso, el tratamiento con un inhibidor de la NADPH oxidasa reduce la producción de ROS en el tejido adiposo, atenuando la desregulada producción de adipocitoquinas y mejorando la diabetes, dislipemia y esteatosis hepática (Furukawa y col., 2004). Subauste y Burant (2007) demostraron en los adipocitos 3T3-L1 que los ácidos grasos reducen los niveles de FoxO1 (un factor de transcripción relacionado con el envejecimiento y la generación de ROS) de manera dosis dependiente. Este efecto es seguido por un incremento en la generación de ROS y una desregulada producción de adipocitoquinas (**Figura 3**).

**Figura 3.** Vías de producción y eliminación de los intermediarios reactivos del oxígeno.<sup>1</sup>



<sup>1</sup> La figura muestra la vías de producción de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (XOR: xantina oxidoreductasa, NAD(P)H oxidasas y compuestos redox reactivos tales como la semi-ubiquinona de la cadena transportadora de electrones mitocondrial), las enzimas antioxidantes capaces de eliminar los ROS (SOD: superóxido dismutasa, catalasa, GPx: glutatión peroxidasa) y el principal antioxidante endógeno no enzimático constituido por el ciclo redox del glutatión. Más detalles se describen en las páginas 21 a 24 del texto. Glc-6P DH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, GR: glutatión reductasa, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado (Modificado de Drogue, 2002). (\*): La XOR también es capaz de reducir triglicérid trinitrito y nitrato (Godber y col., 2000; Millar y col., 1998).

El sistema antioxidante enzimático constituye la primera y mejor línea de defensa contra los ROS. Está integrado por tres enzimas principales que trabajan en cadena para desactivar selectivamente radicales libres: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx). Esta terna catalítica es el sistema anti-oxidante que remueve los aniones superóxido (Lee y col., 2008). La SOD convierte enzimáticamente el superóxido a



peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno puede ser convertido en agua por las enzimas catalasa y GPx (Chang y Chuang, 2010). La obesidad disminuye las defensas antioxidantes disminuyendo los niveles de las enzimas catalasa, GPx y glutatión reductasa (GR) (Hsu y col., 2009). En la reacción de la glutatión peroxidasa el glutatión es oxidado a glutatión disulfuro, el cual puede ser convertido nuevamente a glutatión por la GR en un proceso que consume NADPH. La GR no es estrictamente una enzima antioxidante, sin embargo colabora indirectamente con la GPx y contribuye a regular el pool intracelular de glutatión reducido (GSH), uno de los principales antioxidantes celulares no enzimáticos. Es decir, la GR regenera los depósitos intracelulares de GSH, a partir de glutatión oxidado (GSSG) y NADPH.

El glutatión es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos. Constituye el principal antioxidante endógeno de carácter no enzimático. Puede encontrarse en dos formas según su estado de oxidorreducción: como GSH o GSSG. El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas, entre ellas, mantiene el balance redox en la célula y la protege del estrés oxidativo, nitrosativo y de los reactivos electrofílicos (Sarrasague y col., 2006). El sistema GSH es cuantitativamente la defensa antioxidante endógena más importante (Abilés y col., 2008), y por lo tanto una primera barrera de protección frente al estrés oxidativo. El *Ciclo redox del glutatión* es el mecanismo central para reducir el  $H_2O_2$  y eliminar una variedad de peróxidos tóxicos adicionales. Su deficiencia contribuye al estrés oxidativo, y las células normales mantienen una alta relación intracelular de GSH/GSSG para asegurar la disponibilidad de GSH (**Figura 3**) (Mercier y col., 2008).

Por otro lado, elevados niveles de ROS son capaces de reaccionar con macro moléculas biológicas y producir inactivación de proteínas, peroxidación de lípidos de membrana -aumentando su fluidez y permeabilidad con pérdida de su integridad (Marjani y col., 2010)- y daños al ADN. El estrés oxidativo genera  $H_2O_2$  y malondialdehído (MDA). Los productos de la peroxidación lipídica son formados por sustracción de un átomo de hidrógeno desde un ácido graso insaturado. Los dobles enlaces se reacondicionan para formar dienos. El ataque por un oxígeno molecular produce un peroxirradical lipídico que puede sustraer un átomo de hidrógeno de un lípido adyacente para formar un hidroperóxido lipídico. Algunos de estos son transitorios mientras que otros se acumulan, tales como el



MDA (Mercier, 2008). El MDA es una molécula altamente tóxica y sus productos secundarios tales como las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), son comúnmente utilizados para evaluar la peroxidación lipídica (Marjani y col., 2010).

## 6. MODELOS EXPERIMENTALES:

A nivel experimental existen distintos modelos (genéticos o inducidos nutricionalmente) de dislipemia, resistencia insulínica, diabetes tipo 2, adiposidad visceral, obesidad, etc; que analizan la desregulación funcional del tejido adiposo. Entre los modelos de origen genético se encuentran: la rata obesa Zucker (ZDF), la rata OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty), la rata JCR LA cp (corpulenta), el ratón *ob/ob*, etc; y entre los nutricionales se encuentran: los inducidos por administración crónica de una dieta rica en grasa o azúcares simples (sacarosa, fructosa).

A continuación describimos el modelo experimental de dislipemia, RI, anormal homeostasis de la glucosa y adiposidad visceral inducido por una ingesta crónica de una dieta rica en sacarosa. Esta descripción focaliza con mayor énfasis los aspectos relacionados a la funcionalidad del tejido adiposo ya que el mismo es el eje central de los estudios realizados en la presente tesis.

La administración de una dieta rica en hidratos de carbono simples (sacarosa, fructosa) en forma crónica, a ratas normales, induce hipertrigliceridemia e incremento de los AGNE plasmáticos, alterada homeostasis de la glucosa e insensibilidad insulínica periférica global dependiendo de la cantidad de sacarosa/fructosa dietaria y del tiempo de administración de la dieta (Gutman y col., 1987; Lombardo y col., 1996; Chicco y col., 1999). Estas alteraciones evolucionan en presencia de dislipemia desde normogluceemia e hiperinsulinemia luego de un corto periodo de ingesta de dieta rica en sacarosa (DRS) (3-5 semanas) a moderada hipergluceemia, normoinsulinemia y pronunciada resistencia insulínica periférica global a partir de las 15 semanas. Las anormalidades metabólicas mencionadas se profundizan cuando la dieta se extiende por periodos mas prolongados de tiempo (30-40 semanas). Esto se acompaña de un alterado patrón de secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa (perifusión de islotes aislados) con ausencia del primer pico de secreción y una segunda fase hipersecretora de liberación de la hormona. Los animales alimentados crónicamente con DRS



presentan también un moderado sobrepeso y un sustancial incremento de la adiposidad visceral. Se observa una marcada hipertrofia de los adipocitos del tejido epididimal con un incremento del volumen celular medio asociado a una mayor actividad de las enzimas involucradas en la síntesis *de novo* y del contenido lipídico y una clara alteración de la distribución del tamaño celular (Reaven y col., 1979; Lombardo y col., 1983; Pagliassoti y col., 1996; Chicco y col., 2003; Rossi y col., 2005; Rossi y col., 2010).

Blakely y col. (1982) y Cohen y col. (1972) observaron también en tejido adiposo un incremento significativo en las actividades enzimáticas glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y enzima NADP-malica deshidrogenasa en ratas alimentadas con dieta rica en fructosa o sacarosa durante largos periodos de tiempo (9-12 meses) acompañado de adiposidad visceral. La actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa también incrementó en este tejido en otros modelos de obesidad incluyendo el ratón *db/db*, *ob/ob* o inducidos por dietas (Park y col., 2005). El mayor contenido de triglicéridos en los adipocitos de los animales alimentados con DRS se acompaña de un incremento de la lipólisis basal. Estos adipocitos son incapaces de suprimir completamente las actividades coordinadas HSL y ATGL debido a la RI y, excedida la capacidad buffer, el adipocito no puede almacenar todos los ácidos grasos liberados por las actividades de estas enzimas. Esto da como resultado una excesiva disponibilidad de AGNEs circulantes y / o acumulo en los tejidos no adiposos facilitando aún más el desarrollo de RI, promoviendo la lipotoxicidad (Pighin y col., 2003). La masa expandida del tejido adiposo es más resistente a la acción insulínica (Holm y col., 2000) y muestra además alteraciones en el inventario de las adipocitoquinas que enfatizan la progresión a la RI (Hotamisligil y col., 1995). En este contexto estudios de Rossi y col. (2005) demostraron que en animales alimentados crónicamente con DRS, los niveles plasmáticos de leptina y adiponectina son significativamente menores aunque sin modificaciones en la expresión génica de ambas adipocitoquinas cuando se las compara con animales de igual sexo y edad alimentados con dieta control. En estos animales la actividad antilipolítica de la insulina y la captación de glucosa bajo el estímulo de la hormona fueron significativamente menores (Soria y col., 2002; Rossi y col., 2010).

Diferentes factores pueden relacionarse con el decrecimiento de los niveles de leptina plasmática en presencia de adiposidad en los animales alimentados crónicamente con DRS. Entre ellos es posible que un incremento en el contenido intracelular de ácidos grasos - como consecuencia de una mayor lipólisis- así como a una continua exposición del tejido adiposo a



niveles elevados de AGNE plasmáticos, podrían ser algunos de los mecanismos involucrados en la menor leptinemia. Al respecto, Shintani y col. (2000) y Cammisotto y col. (2003) demostraron que los niveles de la masa proteica y el ARNm de la leptina disminuían en presencia de triacina y de ácidos grasos de cadena larga mono y polinosaturados en cultivo de adipocitos de ratas normales.

Elevados niveles de TNF- $\alpha$  se asocian también con obesidad donde la expresión del TNF- $\alpha$ , masa proteica y niveles plasmáticos se incrementan siendo un factor importante en la RI por modificación de la activación del receptor de insulina, la fosforilación del IRS-1 y el decrecimiento de la síntesis y translocación del transportador GLUT4 (Qi y Pekala, 2000; Hotamisligil y col., 1993). Al respecto un estudio de Aguilera y col. (2004) demostró un incremento en los niveles de TNF- $\alpha$  plasmáticos en ratas alimentadas crónicamente con DRS (30% en agua de bebida). En estos animales el aumento de los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  se acompaña de adiposidad abdominal, sobrepeso, dislipidemia e intolerancia a la glucosa. Además, Liang y col. (2008) observaron un incremento significativo en el contenido de TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con una dieta rica en sacarosa y grasa por un periodo similar (veinte semanas) y Nara y col. (1999) demostraron que el contenido de TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo incrementa ya a las cuatro semanas de la administración de DRS.

Se ha sugerido que la proteína desacoplante UCP2 podría jugar un rol importante en la homeostasis energética en situaciones de elevados niveles de ácidos grasos libres circulantes (Saleh y col., 2002). Al respecto, Murase y col. (2001) demostraron un incremento en la expresión del ARNm de la UCP2 en el tejido adiposo de ratones C57BL/6J alimentados por 5 meses con una dieta rica en triacilglicerol (30%). En ratas Wistar, se ha observado que una dieta rica en grasa y sacarosa administrada durante 4 semanas también incrementa los niveles del ARNm de la UCP2 en tejido adiposo (Wang y col., 2007).

Algunas evidencias sugieren que dislipemia o dietas ricas en carbohidratos simples o grasas que favorecen la generación de ROS inducen estrés oxidativo. En roedores normales alimentados con dietas ricas en fructosa/sacarosa los resultados son en algunos casos contradictorios. Girard y col. (2005) demostraron que dietas que combinan fructosa (18%) y ácidos grasos (11%) administradas a ratas Wistar normales durante 8 semanas desarrollan



hipertrigliceridemia y un incremento en la capacidad total antioxidante en tejido adiposo y otros tejidos. Roberts y col. (2000) en cambio, administrando dietas ricas en sacarosa por períodos de 12 y 18 meses observaron hipertensión, disfunción endotelial y stress oxidativo. Más aún, Rebolledo y col. (2008) han demostrado en el tejido adiposo de ratas Wistar a las que se les suministró fructosa (10%) en agua de bebida durante 3 semanas, un incremento en los TBARS y en las actividades enzimáticas catalasa, glutathion transferasa y glutathion reductasa junto con una disminución en las actividades de la superóxido dismutasa y glutathion peroxidasa. Las diferentes respuestas podrían deberse al tiempo de administración, tipo y cantidad de carbohidratos presentes en las dietas.

Numerosos estudios experimentales y epidemiológicos han demostrado que la composición de los macronutrientes de la dieta son determinantes ambientales importantes en la prevención y/o mejoramiento de numerosos desórdenes metabólicos incluidos en el Síndrome metabólico. En este sentido los ácidos grasos de cadena larga, n-3 PUFAs, especialmente el ácido eicosapentaenoico (EPA 20:5, n-3) y docosahexaenoico (DHA 22:6, n-3) los cuales son abundantes en fitoplancton, peces, ostras y animales marinos y escasean o están ausentes en animales y plantas terrestres (Din y col., 2004), parecen jugar un rol importante sobre los efectos adversos de este Síndrome (Lombardo y Chicco, 2006; Clarke, 2001; Carpentier y col., 2006). Entre otras acciones, estos ácidos grasos regulan funciones cardiovasculares e inmunes así como la acción insulínica (Harris y col., 1997; Kelley y col., 1999; Mori y col., 2000; Benatti y col., 2004; Kris-Etherton y col., 2002; Connor, 2000). Los PUFAs son importantes mediadores de eventos nucleares regulando la expresión de genes específicos involucrados en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa y en la adipogénesis (los n-3 PUFAs regulan dos grupos de factores de transcripción tales como SREBPs y PPARs) (Jump y col., 2005). Además de los efectos hipolipemiantes, los ácidos grasos dietarios de origen marino pueden inducir cambios en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana, lo cual modifica procesos mediados por membrana tales como: señales de traducción de insulina, actividades de lipasas y biosíntesis de eicosanoides. Así por ejemplo 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 (Connor, 2000; Storlien y col., 1998). Más aún los ácidos



grasos n-3 tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, antiarrítmicas y vasodilatadoras, siendo algunos de estos efectos modulados a través del metabolismo de las prostaglandinas y los leucotrienos (Benatti y col., 2004).

Como se ha mencionado anteriormente el tejido adiposo juega un rol importante en el desarrollo del Síndrome metabólico. Diferentes estudios han observado el efecto beneficioso de los n-3 PUFAs dietarios en modular algunos aspectos del metabolismo y de las funciones secretoras del tejido adiposo (Lombardo y Chicco, 2006). Al respecto, Soria y col. (2002) y Rossi y col. (2010) demostraron que la presencia de los n-3 PUFAs (aceite de hígado de bacalao) en animales alimentados crónicamente con DRS (6-8 meses) disminuye la hipertrofia celular (mejorando las actividades de las enzimas lipogénicas), la adiposidad visceral y el moderado incremento de peso corporal. La presencia de los n-3 en la DRS normalizó los elevados niveles de AGNE plasmáticos, la resistencia insulínica periférica global y la captación de glucosa por el tejido adiposo (Rossi y col., 2010). En esta línea, Raclot y col. (1997) y Haug y Hostmark (1987) demostraron que la ingesta de n-3 PUFAs, principalmente 22:6 n-3, disminuye los niveles de ARNm de las enzimas sintetasa de ácidos grasos y lipoproteína lipasa en el tejido adiposo retroperitoneal de ratas alimentadas con dieta rica en grasa. Benhizia y col. (1994) demostraron que el aceite de pescado comparado con la grasa de cerdo o aceite de maíz es más efectivo en disminuir la actividad y los niveles de ARNm de la sintetasa de ácidos grasos en el tejido adiposo blanco de ratas. Peyron-Caso y col. (2002a) demostraron que cuando el aceite de pescado fue administrado en la DRS como fuente grasa durante 3 semanas, se incrementó el transporte de la glucosa estimulada por insulina y su oxidación e incorporación a lípidos en adipocitos aislados. Estos autores también observaron un incremento de los niveles de ARNm y de la proteína del transportador GLUT4 utilizando el mismo diseño experimental. Más aún, Vråna y col. (1988) demostraron el efecto beneficioso de los ácidos grasos n-3 sobre la acción insulínica en adipocitos aislados de ratas alimentadas durante 3 semanas con DRS. La ingesta de n-3 PUFAs modifica la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana (Hein y col., 2010; Lombardo y col., 2007). Al respecto, Luo y col. (1996) demostraron que la acción insulínica se correlaciona positivamente con el grado de insaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana de los adipocitos de ratas cuando los n-3 PUFAs representan la fuente principal de lípidos en la DRS; este podría ser uno de los mecanismos involucrados en la normalización de la sensibilidad insulínica periférica global y del tejido adiposo en particular observado en



animales alimentados con esta dieta. La adición de n-3 PUFAs a la DRS normaliza los disminuidos niveles plasmáticos de leptina y adiponectina sin cambios en la expresión génica de ambas adipocitoquinas (Rossi y col., 2005).

El / los mecanismos involucrados en la hipoleptinemia en presencia de una importante adiposidad visceral e incremento de AGNEs plasmáticos y su normalización por los n-3 PUFAs dietarios no están bien dilucidados. Al respecto, Murata y col. (2000) reportaron que el EPA estimula la secreción y la expresión génica de leptina en adipocitos 3T3-L1 en cultivo, mientras que Resseland y col. (2001) observaron que los n-3 PUFAs dietarios decrecen la expresión de la leptina *in vivo* e *in vitro*.

Los n-3 PUFAs pueden influenciar los niveles del TNF- $\alpha$ . Al respecto, Aguilera y col. (2004) demostraron que la administración de n-3 PUFAs como fuente de grasa dietaria durante 6 semanas a ratas alimentadas con una DRS (30%) por 27 semanas no modificó los elevados niveles plasmáticos de esta adipocitoquina cuando se los comparó con animales de igual sexo y edad en los cuales la fuente de grasa dietaria de la DRS fue el aceite de maíz.

Otro posible mecanismo que incluye a los n-3 (especialmente el EPA) o sus metabolitos, ligando natural de los PPARs, es activando la expresión del PPAR- $\gamma$  en el tejido adiposo blanco, induciendo el incremento coordinado de un gran número de genes involucrados en el metabolismo lipídico (Jump y col., 2005) los cuales también podrían estar implicados en el conjunto de los cambios descriptos anteriormente.

# **OBJETIVOS**



## **OBJETIVOS:**

De todo lo expuesto se observa un rol central del tejido adiposo en el desarrollo de las anomalías metabólicas que semejan a las descritas en el Síndrome metabólico. En este contexto el modelo experimental “no genético” de dislipemia, insulino resistencia y adiposidad visceral inducido por una ingesta crónica (6 - 8 meses) de dieta rica en sacarosa anteriormente descrito, fue utilizado en el transcurso de esta tesis para desarrollar los siguientes **objetivos generales**:

1. Evaluar aspectos bioquímicos y funcionales del tejido adiposo que podrían jugar un rol clave en la dislipemia e insulino resistencia inducida por administración crónica (8 meses) de una dieta rica en sacarosa: mecanismos que relacionan AGNE, adipocitoquinas, receptor activador de la proliferación peroxisomal  $\gamma$ , adiposidad visceral y algunos aspectos del estrés oxidativo.
2. Si el disturbo del metabolismo lipídico a nivel plasmático (incremento de AGNE y triglicéridos) y tisulares es uno de los factores más importantes involucrados en las alteraciones antes mencionadas, evaluamos la posibilidad de mejorar y/o revertir dichas anomalías utilizando cambios nutricionales adecuados: ácidos grasos n-3 de origen marino.

De acuerdo a los objetivos generales propuestos y a las consideraciones globales y fundamentos sobre la importancia del tema a analizar se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- Evaluar los mecanismos involucrados en la secreción de leptina en adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal. Analizar la acción de los ácidos grasos y la insulina sobre la secreción de leptina. Determinar los niveles de adiponectina plasmáticos y su relación con los niveles de AGNE y resistencia insulínica. Evaluar en el tejido adiposo epididimal el contenido de leptina, TNF- $\alpha$  y la expresión de la masa proteica del PPAR- $\gamma$  y la UCP2.



- Evaluar diferentes marcadores del estrés oxidativo en tejido adiposo epididimal: actividad de la xantino oxidoreductasa, enzimas antioxidantes: glutatión peroxidasa, catalasa y glutatión reductasa, contenido de glutatión y TBARS.
  
- Determinar el efecto de la sustitución dietaria parcial del aceite de maíz (rico en ácidos grasos n-6) por aceite de hígado de bacalao (rico en ácidos grasos n-3) en los dos últimos meses de ingesta sobre los aspectos antes mencionados.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **MATERIALES Y METODOS:**

### **1. Animales y dietas**

Se utilizaron ratas macho Wistar C.F. provenientes de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Buenos Aires, Argentina; con un peso inicial de 180-200g (adultos jóvenes). 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 un ambiente climatizado ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) 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**.

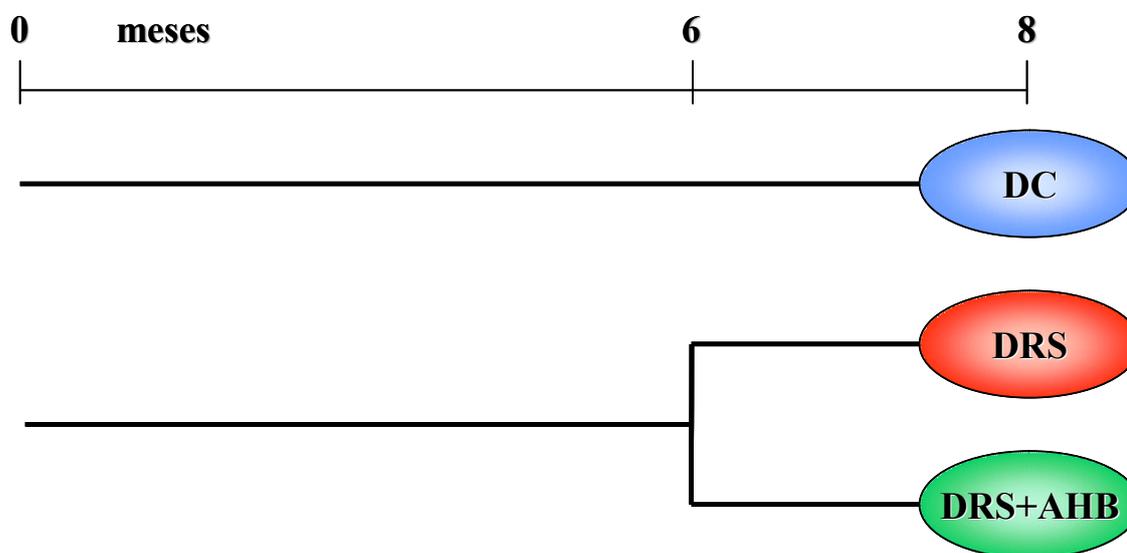
El **grupo control** recibió una dieta semisintética cuya fuente de hidratos de carbono fue almidón (62,5% p/p) (**DC**).

El **grupo experimental** fue alimentado con la misma dieta semisintética con la única modificación en la fuente de hidratos de carbono, la sacarosa reemplazó al almidón (62,5% p/p) (**DRS**). Luego de 6 meses de ingesta el grupo experimental DRS se dividió aleatoriamente en dos subgrupos: un subgrupo continuó con DRS hasta el final de la experiencia (8 meses), mientras que en el otro subgrupo se sustituyó la fuente de grasa dietaria, 8% aceite de maíz (AM) por 7% aceite de hígado de bacalao (AHB: rico en ácidos grasos polinosaturados n-3) más 1% de AM (**DRS + AHB**).

Los animales del grupo control continuaron con la DC hasta alcanzar los 8 meses de ingesta, de acuerdo a lo descripto en el esquema experimental (**Figura 4**).

Las dietas DC y DRS fueron balanceadas en colesterol y vitamina A presentes en el AHB durante los últimos 2 meses de experiencia.

Ambas dietas fueron preparadas semanalmente siguiendo las recomendaciones de la dieta AIN-93 M del Instituto Americano de Nutrición (Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76 A Rodent Diet) y se conservaron a  $4^\circ\text{C}$  (Reeves y col., 1993).

**Figura 4.** Diseño experimental.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> La figura muestra el diseño experimental de la administración de las diferentes dietas a lo largo del periodo de ingesta. DC: dieta control; DRS: dieta rica en sacarosa; DRS + AHB: dieta rica en sacarosa mas aceite de hígado de bacalao.

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 Kjoule/100g de comida y fueron administradas *ad libitum* durante el período experimental. El AHB fue separado en alícuotas bajo corriente de nitrógeno, guardado a -20°C e incorporado diariamente a la dieta descongelando las alícuotas necesarias de acuerdo al tamaño del lote de animales en experimentación.

Más detalles sobre la preparación, contenido y manejo de las dietas se han descrito previamente por nuestro grupo (Rossi y col., 2005).

Durante el transcurso de la experiencia el peso de cada animal fue registrado dos veces por semana. Se determinaron las ingestas energéticas y las ganancias de peso individuales de las ratas pertenecientes a los distintos grupos dietarios.

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Investigación Humana y Animal de la Facultad de Bioquímica, Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina).

**Tabla 1.** Composición de las dietas experimentales (% en peso y % en kJ).<sup>1</sup>

DIETA	DC		DRS		DRS + AHB	
	(% en peso)	(% en kJ)	(% en peso)	(% en kJ)	(% en peso)	(% en kJ)
Almidón	<b>62,5</b>	<b>64,1</b>	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	<b>62,5</b>	<b>64,1</b>	<b>62,5</b>	<b>64,1</b>
Aceite de maíz	<b>8</b>	<b>18,5</b>	<b>8</b>	<b>18,5</b>	<b>1</b>	<b>2,3</b>
AHB	-	-	-	-	<b>7</b>	<b>16,2</b>
Caseína libre de vitaminas	<b>17</b>	<b>17,4</b>	<b>17</b>	<b>17,4</b>	<b>17</b>	<b>17,4</b>
Celulosa	<b>7,5</b>	-	<b>7,5</b>	-	<b>7,5</b>	-
Mezcla de sales <sup>2</sup>	<b>3,5</b>	-	<b>3,5</b>	-	<b>3,5</b>	-
Mezcla de vitaminas <sup>3</sup>	<b>1</b>	-	<b>1</b>	-	<b>1</b>	-
Metionina	<b>0,3</b>	-	<b>0,3</b>	-	<b>0,3</b>	-
Cloruro de colina	<b>0,2</b>	-	<b>0,2</b>	-	<b>0,2</b>	-

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

<sup>2</sup>Mezcla de sales basadas en la mezcla AIN-93 M-MX (en g/Kg de mezcla). Carbonato de calcio, 357,0; fosfato monobásico de potasio, 250,0; cloruro de sodio, 74,0; sulfato de potasio, 46,6; citrato de potasio monohidrato, 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; para-molibdato de amonio, 0,00795; cromato de potasio, 0,275.

<sup>3</sup>Mezcla de vitaminas basadas en la mezcla de AIN-93 M-VX (en g/Kg de mezcla). 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 D<sub>3</sub> (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 ésteres metílicos mediante calentamiento a reflujo durante 8 horas en una solución de 5% de HCl<sub>(g)</sub> en metanol anhidro). Los ácidos grasos fueron identificados por el tiempo de retención en comparación con estándares conocidos.

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 periodo experimental.



**Tabla 2.** Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de las diferentes fuentes de grasa.<sup>1</sup>

<b>ACIDOS GRASOS</b> <sup>2</sup>	<b>AM</b> <sup>3</sup>	<b>AM + AHB</b> <sup>4</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
<b>Total</b>		
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>1</sup> Composición de ácidos grasos del aceite de hígado de bacalao (% 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>2</sup> Otros ácidos grasos menores se han excluido.

<sup>3</sup> Aceite de maíz (AM) Mazola (Best Foods, Canadá, Starch, Montreal, Que., Canadá).

<sup>4</sup> Incluye 1% p/p AM y 7% p/p aceite de hígado de bacalao (AHB) (MP Biomedicals, Inc. Ohio, USA).



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

<b>ACIDOS GRASOS</b>	<b>DC y DRS</b>	<b>DRS+AHB</b>
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 8 y 10 hs, a excepción de aquellas destinadas a la experiencia de la clamp euglucémica-hiperinsulinémica en los cuales se procedió como se detalla más adelante.

- Muestras de sangre fueron extraídas de la vena cava inferior, colocadas en tubos de centrífuga (con o sin anticoagulante, según el ensayo) previamente enfriadas y centrifugadas a 3500 x g durante 15 minutos en centrífuga refrigerada a 4°C. El plasma o suero obtenido se procesó en el momento o se conservó a -20°C hasta su procesamiento (dentro de los tres días siguientes o no mayor a una semana). Estas muestras se utilizaron para cuantificar los niveles de glucosa, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados e insulina. Las muestras utilizadas para cuantificar los niveles de leptina y adiponectina se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.
  
- Los tejidos adiposos fueron obtenidos inmediatamente después de la extracción de sangre y de acuerdo a la técnica a realizarse, se utilizaron de inmediato (aislamiento de adipocitos, determinación del contenido de leptina y tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) o fueron congelados a la temperatura de nieve carbónica utilizando una pinza de Wolleberger previamente enfriada a dicha temperatura y conservados a -80°C hasta su procesamiento.



### **3. Procedimientos experimentales: Métodos analíticos**

#### **3.1. Determinaciones séricas**

##### **3.1.1. Glucosa**

La glucosa presente en el suero de ratas 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.

##### **3.1.2. Triglicéridos**

Los triglicéridos presentes en el suero de ratas, se cuantificaron utilizando el kit enzimático comercial Wiener (Wiener Laboratorios S.A.I.C., Rosario, Argentina) basado en un método enzimático colorimétrico. Los resultados se expresaron como mM.

##### **3.1.3. Ácidos grasos no esterificados (AGNE)**

Se cuantificaron utilizando el método espectrofotométrico que emplea acil-CoA sintetasa en presencia de ATP,  $Mg^{2+}$  y CoA para transformarlos, en una primera etapa, en acil-CoA. En una segunda etapa, éste es oxidado por la acil-CoA 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  $\mu M$ .

##### **3.1.4. Colesterol total**

El colesterol total (suma del colesterol libre y esterificado) presente en el suero de ratas, se cuantificó espectrofotométricamente utilizando el kit enzimático comercial Wiener (Wiener Laboratorios S.A.I.C., Rosario, Argentina). Los resultados se expresaron en mM.



### 3.1.5. Insulina

La insulina inmunorreactiva fue dosada por el método propuesto por Herbert y col. (1965) utilizando como estándar insulina de rata (Novo Nordisk Denmark). La sensibilidad fue de 0,5  $\mu$ 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  $\mu$ 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 pM.

### 3.1.6. Adiponectina y leptina

Los niveles de adiponectina y leptina en el suero de ratas se cuantificaron utilizando un kit de ELISA sándwich para rata (EZRADP-62K, Rat adiponectin ELISA kit, sensibilidad: 0,155 ng/ml y EZRL-83K Rat leptin ELISA kit, sensibilidad: 0,04 ng/ml; Linco Research Inc., St. Charles, MO, USA). Las muestras, los estándares y los controles de calidad se cuantificaron por triplicado. Los resultados de adiponectina y leptina se expresaron como  $\mu$ g/ml y ng/ml, respectivamente.

## 3.2. Estudios *in vivo*

### 3.2.1. 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.

La clamp euglucémica-hiperinsulinémica fue realizada de acuerdo a la metodología propuesta por De Fronzo y col. (1979) y utilizada en distintos trabajos del grupo (Chicco y col., 2003; 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 ( $0,8 \text{ U/Kg} \times \text{hora}^{-1}$ ) 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 ( $5,5\text{-}6,0 \text{ mM}$ , 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  $\text{mg glucosa/Kg} \times \text{minuto}^{-1}$ . El hematocrito medido al comienzo y al final de la experiencia se mantuvo constante.

### **3.3. Determinaciones en tejido adiposo epididimal**

#### **3.3.1. Aislamiento de adipocitos**

Una vez extraído el tejido adiposo epididimal, se lavó rápidamente en solución salina tibia ( $\text{NaCl } 0,9 \text{ g } \%$  a  $37^\circ\text{C}$ ), se secó con papel absorbente y se pesó. Las porciones distales de cada epidídimo se cortaron en trozos. En aproximadamente  $0,2$  gramos de tejido, se determinó el contenido lipídico total de acuerdo a la técnica propuesta por Folch y col. (1957).

Para el aislamiento de adipocitos se utilizó la metodología indicada por Rodbell (1964). Brevemente, alrededor de un gramo de tejido epididimal se colocó en un erlenmeyer de  $25 \text{ ml}$  conteniendo  $3 \text{ ml}$  de buffer Krebs-Henseleit fosfato ( $\text{pH}=7,4$ ) adicionado de:  $\text{Ca}^{+2}$   $1,25 \text{ mM}$ , glucosa  $5,5 \text{ mM}$ , albúmina sérica bovina esencialmente libre de ácidos grasos (fracción V)  $40 \text{ mg/ml}$  y colagenasa aislada del *Clostridium histolyticum* (específica para el aislamiento de adipocitos)  $1 \text{ mg/ml}$ , a  $37^\circ\text{C}$ . La digestión se realizó en un agitador metabólico tipo Dubnoff a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora, con una agitación de  $60\text{-}80$  giros/minuto. La liberación de células se puso de manifiesto con un incremento en la turbidez del medio de incubación.



Finalizado el tiempo de incubación, las células grasas se separaron del estroma y de los vasos sanguíneos por filtración a través de una malla de nylon, presionando suavemente sobre una varilla de vidrio. La suspensión de células obtenidas se centrifugó durante un minuto a 400 x g, de esta manera los adipocitos flotan en la superficie mientras que las células vasculares y del estroma (capilares, macrófagos, mastocitos y células epiteliales) sedimentan.

Finalizada la centrifugación, los adipocitos fueron removidos cuidadosamente por aspiración y lavados por resuspensión en aproximadamente 6 ml del buffer descrito anteriormente, a 37°C y sin adición de colagenasa, con posterior centrifugación (1 minuto a 400 x g). Este procedimiento de lavado se repitió dos veces.

Las gotas de grasa provenientes de la rotura de los adipocitos, que se dirigen más rápidamente hacia la superficie que las células grasas, se eliminaron por aspiración luego de una suave agitación de la suspensión celular.

Una vez concluidos los lavados correspondientes, las células grasas se resuspendieron en un volumen adecuado de buffer Krebs-Henseleit fosfato (pH = 7,4) con  $\text{Ca}^{+2}$  1,25 mM, glucosa 5,5 mM y albúmina sérica bovina (fracción V) esencialmente libre de ácidos grasos 40 mg/ml a 37°C, para obtener una suspensión final de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/ml.

### **3.3.2. Determinación del diámetro, área y volumen promedio de los adipocitos aislados**

Se utilizó el método de examen microscópico de preparaciones frescas de células aisladas por digestión con colagenasa, propuesto por Di Girolamo y col. (1971) y utilizado previamente por nuestro grupo de trabajo (Soria y col., 2001).

Brevemente, a 1 ml de la suspensión celular (obtenido según lo descrito en el ítem anterior) se le agregaron 2-3 gotas de una solución acuosa de azul de metileno al 1%. Una alícuota de esta suspensión de células grasas teñidas se ubicó en un portaobjetos y se examinó al microscopio. Los diámetros de los adipocitos aislados se midieron con un aumento de 40X, utilizando un ocular graduado provisto con una escala con intervalos regulares de 2,5  $\mu\text{m}$  cada uno.

Un único observador midió de 100 a 300 células grasas correspondientes a cada epidídimo analizado. A partir de estos datos se calculó el diámetro celular medio (DCM) y su varianza ( $S^2$ ).



Cuando los diámetros obtenidos se dispusieron según una distribución normal, se empleó para el cálculo del volumen celular medio (VCM) la fórmula propuesta por Goldrick (1967):

$$\text{VCM} = \frac{\pi \times (3S^2 + \text{DCM}^2) \times \text{DCM}}{6}$$

donde:  $\pi = 3,1416$

DCM = diámetro celular medio

$S^2$  = varianza del diámetro celular medio

Estas fórmulas consideran al sesgo que se produce cuando se grafica el cuadrado y el cubo de una variable normalmente distribuida y proveen, en cada caso, una mejor estimación que el cuadrado y el cubo del diámetro medio.

Si los diámetros obtenidos no se disponen según una distribución normal, el VCM se obtiene promediando los volúmenes correspondientes a los distintos diámetros mediante las fórmulas:

$$\text{VCM} = \frac{\sum n_i V_i}{n}$$

donde:  $V_i$  = volumen correspondiente al diámetro  $X_i$

$n_i$  = frecuencia correspondiente al diámetro  $X_i$

$n$  = número total de diámetros medidos ( $n=100$ )

### 3.3.3. Determinación del contenido lipídico celular medio

Se realizó la estimación del contenido lipídico celular medio (CLCM) en base a las siguientes suposiciones:

- Las gotas de lípido asumen una configuración esférica en las células grasas, de manera tal que la determinación del diámetro transversal de la célula representa esencialmente el diámetro de la gota lipídica (Di Girolamo y col., 1971); y
- La densidad lipídica intracelular es similar a la de la trioleína: 0,915 (Di Girolamo y col., 1971, Sinnott-Smith y Waddington, 1992).



De esta manera:

$$\text{CLCM} = \text{VCM} \times \delta_{\text{TO}}$$

donde:  $\delta_{\text{TO}}$  = es la densidad de la trioleína.

### 3.3.4. Determinación de la celularidad del tejido adiposo epididimal

Si bien en distintos tejidos, la celularidad puede ser determinada por su contenido de ADN, esto no es del todo conveniente en el tejido adiposo debido a que, aún cuando los adipocitos son los constituyentes principales del tejido, las células del estroma representan la fuente más importante de material nuclear extractable.

Por esto, la estimación del número de células grasas en el epidídimo se obtuvo dividiendo el contenido lipídico total del tejido (CLT) por el contenido lipídico celular medio (CLCM), presumiendo que todo o casi todo el lípido contenido en el tejido adiposo es intracelular (Di Girolamo y col., 1971).

Para determinar el CLT del tejido adiposo se realizó una extracción de los lípidos totales homogeneizando una porción del tejido con una mezcla cloroformo/metanol (2/1 v/v) en un homogeneizador del tipo Potter-Elvehjen, procediendo de acuerdo al método propuesto por Folch y col. (1957). Considerando que los triglicéridos son la fracción constitutiva más importante de los lípidos adipocitarios, se determinó su concentración en el extracto lipídico, dosando el glicerol liberado luego de la saponificación de los mismos.

Aunque la metodología empleada en los ítems 3.3.2, 3.3.3 y 3.3.4 está sujeta a las limitaciones impuestas por el uso de ciertas suposiciones, es importante destacar algunos aspectos valiosos de la misma:

- a) La estimación del número total de células grasas presenta límites de confianza en el nivel 95% de  $\pm 5-10\%$ .
- b) El muestreo es representativo de la población celular original en el tejido debido a que se emplea un gran número de células aisladas cuidadosamente homogeneizadas.
- c) Permite cuantificar el grado de dispersión del tamaño celular en una población determinada y, dado que la heterogeneidad es un atributo natural importante de la población celular, posibilita incorporar un elemento más al análisis de la misma.



### 3.3.5. Determinación del número de adipocitos en la suspensión celular

Se utilizó una metodología similar a la detallada para la determinación del número de células grasas en el tejido adiposo descrita en el ítem anterior. En una primera etapa se procedió a cuantificar el contenido lipídico por ml de suspensión celular (CL/ml SC), para lo cual se extrajeron y purificaron los lípidos totales de una alícuota de la suspensión, de acuerdo con lo descrito por Folch y col. (1957), y se determinó finalmente la concentración de triglicéridos por ml de suspensión.

La estimación del número de células por ml de suspensión se obtuvo dividiendo el CL/ml SC por el CLCM.

Fue necesaria una manipulación cuidadosa en cada uno de los pasos involucrados tanto en la preparación como en la utilización de la suspensión celular a fin de que los triglicéridos dosados en la misma reflejen solamente los triglicéridos celulares de adipocitos intactos, y por ende, fisiológicamente activos, y no sea significativo el aporte de triglicéridos provenientes de la rotura de los mismos.

### 3.3.6. Determinación del glicerol liberado en adipocitos aislados

Los adipocitos (aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/ml), obtenidos de acuerdo a lo descrito anteriormente, fueron incubados en buffer Krebs-Henseleit fosfato (pH=7,4) adicionado de  $\text{Ca}^{+2}$  1,25 mM, glucosa 5,5 mM y albúmina sérica bovina esencialmente libre de ácidos grasos (fracción V) 4%. La incubación se realizó durante una hora a 37°C, en un agitador metabólico tipo Dubnoff (60 ciclos/minuto), bajo una atmósfera de  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95%:5%).

Finalizado el tiempo de incubación, se extrajo una alícuota del medio infranadante libre de células grasas y se procedió inmediatamente a su desproteinización, con ácido perclórico 1 N. La mezcla se agitó vigorosamente y luego se centrifugó 15 minutos a 2000 x g. El sobrenadante neutralizado (pH=7,0-8,0) con KOH 1N, se mantuvo en baño de hielo por 10 minutos para asegurar la completa precipitación del perclorato de potasio y fue centrifugado posteriormente. En el sobrenadante obtenido, se determinó la cantidad de glicerol liberado por la suspensión celular al medio de incubación utilizando el método fluorométrico de Davidson y Karjala (1970). Este método se basa en la medida fluorométrica del  $\text{NADH}_2$  que se forma cuando el glicerol es oxidado por la enzima glicerol dehidrogenasa. Brevemente, el sobrenadante (por duplicado) o los estándares (glicerol) ya desproteinizados,



se incubaron a temperatura ambiente por 90 minutos con una mezcla de reacción conteniendo 6 mg de  $\text{NAD}^+$  y 0,1 U de glicerol dehidrogenasa (1 unidad de glicerol dehidrogenasa oxida 1  $\mu\text{mol}$  de glicerol a dehidroxiacetona por minuto a  $25^\circ\text{C}$  a  $\text{pH}=10,0$ ) en buffer glicina 0,05 M,  $\text{pH}=9,5$  (Davidson y Karjala, 1970). Se midió la fluorescencia producida por el  $\text{NADH}_2$  con filtros de excitación a 350 nm y de emisión a 465 nm. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}/10^6 \text{ cel} \times \text{h}^{-1}$ .

### 3.3.7. Determinación de la secreción de leptina en adipocitos aislados

Otra fracción de las células adiposas aisladas de acuerdo al método descrito previamente en el ítem 3.3.1 fueron preincubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 15 minutos en un agitador metabólico tipo Dubnoff con una agitación de 60 ciclos/minuto en buffer Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) ( $\text{NaCl}$  120 mM,  $\text{KCl}$  4,75 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, glucosa 5,5 mM y HEPES 20 mM  $\text{pH}=7,4$ ) adicionado de albúmina sérica bovina esencialmente libre de ácidos grasos (fracción V) 1%. Luego, los adipocitos fueron lavados 2 veces por resuspensión en el buffer KRB, a  $37^\circ\text{C}$  y con la adición de albúmina sérica bovina esencialmente libre de ácidos grasos (fracción V) 0,1% (debido a que la albúmina se une a los ácidos grasos extracelulares) acorde a lo descrito previamente por Cammisotto y col. (2003). Finalmente, los adipocitos aislados fueron incubados en buffer KRB con la adición de 0,1% de albúmina sérica bovina esencialmente libre de ácidos grasos (fracción V), a  $37^\circ\text{C}$ , en un incubador tipo Dubnoff (60 ciclos/min) durante 2 horas bajo corriente de  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5) y en presencia o ausencia de los siguientes efectores: insulina 10 nM, isoproterenol 10  $\mu\text{M}$  o ácido palmítico 1 mM a una concentración de  $3-5 \times 10^5$  células/ml. Finalizada la incubación se recolectó el infranadante -posterior a la flotación de las células grasas-, que se conservó a  $-80^\circ\text{C}$  para la determinación de la leptina secretada. La concentración de leptina en los distintos infranadantes fue determinada por triplicado utilizando un kit de ELISA sándwich para rata (EZRL-83K, Rat leptin ELISA kit, Linco Research Inc., St. Charles, MO. Sensibilidad: 0.04 ng/ml) según lo descrito previamente en el ítem 3.1.6. La leptina liberada fue expresada como nanogramos por  $10^6$  células por 2 horas. Debido a la mayor variabilidad en la secreción de leptina basal entre los adipocitos cultivados de diferentes ratas, los resultados experimentales de cada suspensión de adipocitos preparados de un solo animal fueron analizados en relación al animal control.



### **3.3.8. Determinación del contenido de leptina**

Muestras de tejido adiposo epididimal frescas fueron homogenizadas en buffer TES pH=7,4 [Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 225 mM, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 0,1 mM, pepstatin 0,036 mM, Triton X-100 1%], usando un homogenizador de vidrio según lo previamente descrito por Peyron-Caso y col. (2002b) y Russell y col. (2001). Los homogenatos fueron centrifugados a 12000 x g por 10 minutos a 4°C y el contenido de leptina en la fase citosólica fue determinada por triplicado utilizando un kit de ELISA sándwich para rata como se mencionó previamente (item 3.1.6). Los resultados son expresados como la concentración de leptina en nanogramos por gramo de tejido húmedo (TH) o ajustados al peso total del tejido adiposo epididimal.

### **3.3.9. Determinación del contenido del factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

Muestras de tejido adiposo epididimal frescas fueron homogenizadas en buffer TES pH=7,4 según lo descrito en el ítem 3.3.8. El contenido de TNF- $\alpha$  en la fase citosólica se cuantificó por triplicado utilizando un kit de ELISA sándwich para rata (ER3TNFA, Termo Scientific Pierce rat TNF- $\alpha$  ELISA kit, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA). El rango del ensayo fue de 31,3-2500 pg/ml y la sensibilidad de 15 pg/ml. La muestra incógnita se calculó por interpolación a partir de la curva de referencia generada en el mismo ensayo con estándares de TNF- $\alpha$  de rata de concentraciones conocidas. Los resultados se expresaron como la concentración de TNF- $\alpha$  en picogramos por gramo de tejido húmedo (TH) o ajustados al peso total del tejido adiposo epididimal.

### **3.3.10. Análisis de masa proteica por la técnica de Western blot**

#### **3.3.10.1. Receptor activador de la proliferación peroxisomal $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ )**

##### Extracción de proteínas totales:

El tejido adiposo congelado fue homogenizado en 1,66 vol. de buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, pH=7,4) conteniendo 2,4  $\mu$ l de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma, St Louis, USA) por cada 100 mg de tejido. Después de 2 horas de solubilización a 4°C, el material insoluble fue separado de las proteínas solubles por



centrifugación de las muestras a 8000 x g durante 45 min a 4°C (Federici y col., 2001). Las proteínas de los extractos se cuantificaron con el ensayo de Bio-Rad.

#### Análisis por Western blot:

Las muestras, conteniendo 40 µg de proteínas por calle, se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS (SDS-PAGE) de acuerdo a lo descrito por Laemmli (1970). Las proteínas se electro-transfirieron (400 mA constantes) a una membrana de PVDF durante toda la noche empleando un buffer de transferencia (pH= 8,8) que contenía Tris 20 mM, glicina 150 mM, SDS 0,01% y metanol 20%. Las membranas fueron bloqueadas con agitación en buffer Tris (Tris 24,7 mM, NaCl 0,136 mM, KCl 2,683 mM, pH=7,4) conteniendo Tween-20 0,1% y leche descremada 5% durante 8 horas a 4°C. Para el inmunoblotting, las membranas se expusieron al anticuerpo primario específico policlonal: anti-PPAR-γ (dilución: 1/400) (H-100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) a 4°C con agitación durante toda la noche. Luego se incubaron con el anticuerpo secundario (dilución: 1/2000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 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, USA).

La expresión de la masa proteica del PPAR-γ fue normalizada con la expresión de la masa proteica del marcador β-actina (C-4, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el software del National Institute of Health (Bethesda, MD, USA). 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 la señal observada fue de 0,985. Se empleó extracto de músculo esquelético como control positivo del PPAR-γ.

#### **3.3.10.2. Proteína desacoplante 2 (UCP2)**

##### Aislamiento de mitocondrias:

El aislamiento de las mitocondrias fue realizado según el método descrito por Pecqueur y col. (2001). Brevemente, el tejido adiposo congelado fue homogenizado en 1,33



vol. de buffer TES (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 250 mM, pH=7,5) conteniendo 2,4  $\mu$ l de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma, St Louis, USA) por cada 100 mg de tejido. Los restos celulares fueron removidos del homogenato por centrifugación a 750 x g por 10 minutos y el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 10000 x g por 20 minutos, para obtener el pellet mitocondrial, el cual fue resuspendido en buffer TES y sometido nuevamente a una centrifugación de 10000 x g por 10 minutos, resuspendiéndose el pellet en el mínimo volumen de dicho buffer. Las proteínas obtenidas se cuantificaron con el ensayo de Bio-Rad.

Análisis por Western blot:

Las muestras, conteniendo 50  $\mu$ g proteína por calle, se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 14% con SDS (SDS-PAGE) de acuerdo a lo descrito por Laemmli (1970). Las proteínas se electro-transfirieron (130 mA constantes) a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK) toda la noche empleando un buffer de transferencia (pH= 8,8) que contenía Tris 20 mM, glicina 150 mM, SDS 0,1% y metanol 20%. Las membranas fueron bloqueadas con agitación en buffer Tris (Tris 24,7 mM, NaCl 0,1368 mM, KCl 2,683 mM, pH=7,4) conteniendo Tween-20 0,1% y leche descremada 5% durante 8 horas a 4°C. Para el inmunobloting, las membranas se expusieron al anticuerpo primario específico policlonal: anti-UCP2 (dilución: 1/400) (N-19, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) a 4°C con agitación durante toda la noche. Luego se incubaron con el anticuerpo secundario (dilución: 1/2000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) conjugado con horseradish-peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente y se procedió a la detección por quimioluminiscencia, de acuerdo a lo mencionado para la determinación de la masa proteica del PPAR- $\gamma$ .

La expresión de la masa proteica de la UCP2 fue normalizada con la expresión de la masa proteica del marcador  $\beta$ -actina (C-4, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el software del National Institute of Health (Bethesda, MD, USA).

Estudios preliminares demostraron una linealidad en el ensayo de Western blot entre 20 y 80  $\mu$ g de proteínas. El coeficiente de correlación entre la cantidad de proteína y la intensidad de señal observada fue de 0,977.

### 3.3.11. Determinación de actividades enzimáticas

#### 3.3.11.1. Xantino oxidoreductasa

La Xantina oxidoreductasa existe en formas separadas pero interconvertibles: la xantina oxidasa (XO, o xantina-oxígeno oxidoreductasa) y la xantina deshidrogenasa (XD, o xantina-NAD oxidoreductasa). La XO utiliza xantina o hipoxantina como sustrato y oxígeno como cofactor para producir  $\cdot\text{O}_2^-$  y ácido úrico:



Mientras que la XD actúa con los mismos sustratos pero utiliza NAD como cofactor, produciendo NADH en vez de  $\cdot\text{O}_2^-$  y ácido úrico:



El aislamiento de la xantino oxidoreductasa se realizó acorde al método de Maia y Mira (2002), con algunas modificaciones. Brevemente, el tejido adiposo fue homogenizado en 3 vol de buffer fosfato 50 mM, EDTA 0,4 mM, PMSF 100 mM, pH=7,8. El homogenato obtenido fue rápidamente calentado a 55°C con agitación en un baño termostatzado durante 10 minutos, enfriado por debajo de los 10°C en un baño de hielo con agitación y centrifugado a 15000 x g durante 45 minutos a 4°C. El precipitado fue descartado y al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio sólido hasta lograr un 60% de saturación. La solución se agitó durante 30 minutos y el precipitado colectado por centrifugación fue disuelto en buffer fosfato 50 mM, pH=7,8. Se determinó la concentración de proteínas de la muestra por el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

#### Determinación de la actividad de la xantino oxidasa:

La actividad de la xantino oxidasa fue medida adicionando a la muestra, buffer fosfato 50 mM (pH=7,8) y xantina 0,5 mM y monitoreando la producción de ureato a 295 nm ( $\epsilon = 12.2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) a 37°C, acorde al método de McManaman y col. (1996) con algunas modificaciones. Una unidad de actividad catalítica se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de sustrato bajo las condiciones experimentales. Las muestras se ensayaron por duplicado y los resultados se expresaron como mU/mg proteína.

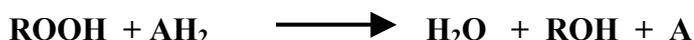


Determinación de la actividad de la xantino oxidoreductasa:

La actividad de la xantino oxidoreductasa (xantino oxidasa + xantino deshidrogenada) fue determinada en la misma mezcla de ensayo que la utilizada para la determinación de la xantino oxidasa, con el agregado de  $\text{NAD}^+$  0,6 mM y monitoreando la producción de ureato a 295 nm ( $\epsilon = 12.2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) a 37°C, acorde al método de McManaman y col. (1996) con algunas modificaciones. Una unidad de actividad catalítica es definida como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de substrato bajo las condiciones experimentales. Las muestras se ensayaron por duplicado y los resultados se expresaron como mU/mg proteína.

### 3.3.11.2. Catalasa

Los niveles de catalasa se determinaron espectrofotometricamente mediante el método propuesto por Lück (1974). La enzima cataliza las siguientes reacciones:



La descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  debido a la acción de la catalasa disminuye su absorción en función del tiempo, y a partir de esta disminución la actividad de la enzima puede ser calculada. La absorción ultravioleta del  $\text{H}_2\text{O}_2$  es fácilmente medida entre los 230 y 250 nm.

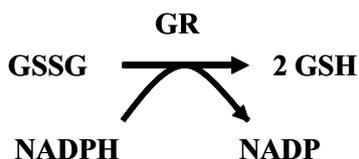
El tejido adiposo fue homogenizado en 2 volúmenes de buffer de homogenización (KCl 154 mM, EDTA 3 mM, pH=7,4). El homogenato fue sonicado y centrifugado a 8000 x g durante 10 minutos a 4°C de acuerdo a Galinier y col. (2006a). En la fracción infranadante se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y la actividad de la catalasa por el método espectrofotométrico antes mencionado. Brevemente, 1 vol. de muestra se mezcló con 6,5 vol. de buffer fosfato (pH=7,0) conteniendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,0125 M previamente titulada y la disminución en la absorbancia fue monitoreada en un espectrofotómetro a 240 nm contra un blanco por 2-3 minutos. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera la mitad del oxígeno-peróxido de la solución de peróxido de hidrógeno en 100 segundos a 25 °C. Las muestras se ensayaron por duplicado y los resultados se expresaron en U/mg de proteína.

### 3.3.11.3. Glutation peroxidasa

El glutatión reducido (GSH) es utilizado por la glutatión peroxidasa (GPx) para la reducción del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y de lipoperóxidos (L-OOH), los cuales son elementos tóxicos. Por lo tanto, la enzima cataliza con alta especificidad la detoxificación *in vitro* del peróxido de hidrógeno según la siguiente reacción:



Los niveles de glutatión peroxidasa se determinaron espectrofotométricamente mediante el método propuesto por Paglia y Valentine (1967), en el cual, la adición exógena de glutatión reductasa y NADPH convierten inmediatamente el glutatión oxidado producido a la forma reducida, según la reacción:



Por lo tanto la formación de glutatión oxidado fue determinada siguiendo la disminución de absorbancia en la mezcla de reacción a 340 nm.

Para este ensayo, el tejido adiposo fue homogenizado en 2 volúmenes de buffer de homogenización (KCl 154 mM, EDTA 3 mM, pH=7,4). El homogenato fue sonificado y centrifugado a 8000 x g durante 10 minutos a 4°C. El infranadante fue posteriormente centrifugado a 105000 x g por 45 minutos a 4°C de acuerdo a Galinier y col. (2006a). En el sobrenadante post-mitocondrial se determinó: la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y la actividad de la GPx por el método espectrofotométrico antes mencionado. Brevemente, al sobrenadante post mitocondrial se le adicionó un buffer fosfato 50 mM pH=7,0 conteniendo EDTA 5 mM, glutatión reductasa 0,33 U/ml,  $\text{NaN}_3$  3,75 mM, glutatión 5 mM y NADPH 0,28 mM. La mezcla de reacción fue equilibrada a 20 °C por 5 minutos y la reacción se inició por el agregado de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,073 mM, cuya concentración fue obtenida por titulación. La conversión de NADPH a NADP se registró cada 15 segundos a 340 nm por 3 a 5 minutos. Una unidad enzimática se define como el número de  $\mu\text{moles}$  de NADPH oxidados por minuto. Las muestras se ensayaron por duplicado y los resultados se expresaron en mU/mg de proteína.



#### 3.3.11.4. Glutation reductasa

La glutatión reductasa (GR) es una flavoenzima dependiente de NADPH que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), según la siguiente reacción:



En el sobrenadante post-mitocondrial de tejido adiposo obtenido como describimos previamente en el **ítem 3.3.11.3**, se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y los niveles de glutatión reductasa mediante el método propuesto por Horn (1974). Brevemente, la muestra se adicionó a un buffer fosfato 0,067 M pH=6,6 conteniendo NADPH 0,1 mM y glutatión oxidado 0,5 mM, y se procedió a leer inmediatamente la absorbancia a 340 nm, a 25°C, al tiempo 1, 2 y 3 minutos exactos. Para cada una de las muestras se preparó un control conteniendo buffer que reemplazó a la solución de glutatión oxidado y se procedió a realizar las determinaciones de la misma manera. Bajo estas condiciones experimentales la reducción del glutatión dependiente de NADPH es lineal en función del tiempo.

Una unidad de glutatión reductasa se define como la cantidad de enzima que reduce 1  $\mu\text{mol}$  de GSSG por minuto a 25°C. Las muestras se ensayaron por duplicado y los resultados se expresaron como mU / mg de proteína.

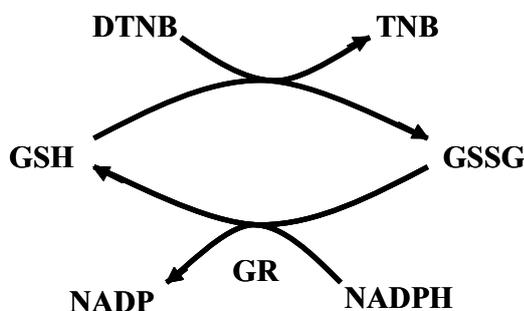
#### 3.3.12. Determinación de la peroxidación de lípidos

La cuantificación de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) en tejido adiposo se realizó por el método descrito por Lee y Csallany (1987). El tejido adiposo fue homogenizado en 4 vol de buffer fosfato de sodio 0,01 M pH=7,0. Al homogenato adicionado de 6 vol. de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1% y 2 vol. de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6%, se lo calentó por 45 minutos en un baño a ebullición en tubo tapado y luego se lo llevó a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue extraída con 8 vol. de n-butanol. La fase butanol fue separada por centrifugación a 2000 x g durante 10 minutos y la absorbancia de esta fase fue medida espectrofotométricamente a 535 y 520 nm. La diferencia de absorbancia fue utilizada para calcular la cantidad de TBARS. Diferentes concentraciones de malondialdehído (MDA), uno de los productos de la peroxidación lipídica preparado por hidrólisis del 1,1,3,3-

tetraetoxipropano, se sometieron al mismo procedimiento, y se preparó una curva estándar para el complejo MDA-TBA. El contenido de TBARS en el tejido adiposo se calculó como equivalente de MDA a partir de dicha curva estándar. Las muestras y estándares se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como nmol/(mg proteína x órgano total).

### 3.3.13. Determinación del contenido de glutatión

Para la determinación de glutatión total y oxidado se utilizó el método colorimétrico originalmente descrito por Griffith (1980), en el cual el GSH es oxidado por el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y reducido por el NADPH en presencia de glutatión reductasa. La mezcla de reacción adquiere coloración amarilla debido a la formación de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), que puede ser monitoreada a 412 nm.



Para la obtención del homogenato se empleó la técnica descrita por May (1980) con algunas modificaciones. Brevemente, el tejido adiposo fue homogenizado en 2 vol de buffer de homogenización (buffer fosfato 0,1 M, EDTA 5 mM, pH=7,5) y centrifugado a 18000 x g durante 5 minutos a 4°C. Del infranadante obtenido se separaron 100 µl para la determinación de proteínas por el método de Lowry y col. (1951), mientras que el resto fue desproteínizado con ácido sulfosalisílico (concentración final 3,75 %). Las proteínas precipitadas fueron removidas por centrifugación a 3000 x g durante 15 minutos a 4°C y en el sobrenadante se determinó el contenido de glutatión total y glutatión oxidado.

#### Glutacion total (GSSG + GSH):

Para la valoración de glutatión total 0,1 vol. de muestra fue mezclado con 0,89 vol. de buffer de homogenización conteniendo NADPH 0,21 mM y DTNB 0,6 mM. Luego de incubar por 5 minutos a 30 °C en oscuridad, se adicionó 0,01 vol. de glutatión reductasa (50



U/ml) y el incremento de absorbancia a 412 nm fue registrado durante 3 a 5 minutos en un espectrofotómetro (Griffith, 1980).

El contenido total de glutatión en la muestra fué determinado por comparación del valor observado con una curva estándar generada a partir de concentraciones conocidas de glutatión reducido. 0,5; 1; 2; 4 y 6 nmol/tubo fueron utilizados para la construcción de la curva de calibrado.

Las muestras y estándares se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como nmol/mg de proteína.

#### Glutacion oxidado (GSSG):

Para la determinación del glutatión oxidado, 0,02 vol. de 2-vinilpiridina 54 mM y 0,06 vol. de trietanolamina (TEA) pura se adicionaron a 1 vol. de muestra y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. La 2-vinilpiridina es utilizada en las muestras para acomplejar todo el glutatión reducido impidiendo su reacción con el DTNB, dejando sólo la forma oxidada del glutatión como único sustrato del ensayo. Dependiendo del pH final, el glutatión reducido es totalmente acomplejado despues de 20-60 minutos a 25°C (Griffith 1980).

La valoración de glutatión oxidado se realizó de igual manera que la de glutatión total y su concentración se calculó a partir de una curva estandar realizada con glutatión oxidado que recibió el mismo tratamiento que la muestra. 0,5; 1; 1,5; 2 y 4 nmol/tubo fueron utilizados para la construcción de la curva de calibrado.

Las muestras y estándares se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como nmol/mg de proteína.

#### **4. Reactivos utilizados**

El aceite de hígado de bacalao fue provisto de ICN (Costa Mesa, CA, USA). Los anticuerpos primarios y secundarios para las determinaciones de las masas proteicas fueron provistos por Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Enzimas, sustratos y coenzimas utilizados en las técnicas previamente detalladas fueron provistos por SIGMA (St. Louis, Mo., 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 la base de medidas hechas previamente en nuestro laboratorio con ratas alimentadas con DC y DRS (Gutman y col., 1987; Lombardo y col., 1996; Soria y col., 2002; Rossi y col., 2005), considerando un poder del 80%.

Los resultados experimentales se expresan 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 intraclase fueron de al menos 0,73.

# **RESULTADOS EXPERIMENTALES**



## **RESULTADOS EXPERIMENTALES:**

### **PARTE 1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO:**

En primer lugar analizamos algunos aspectos generales que caracterizan el modelo DRS y la acción del AHB dietario sobre parámetros plasmáticos, incremento de peso y resistencia insulínica periférica global, con el fin de corroborar los resultados previamente demostrados. Además en el tejido adiposo epididimal determinamos el número y volumen celular como así también el contenido de triglicéridos y la distribución de los adipocitos.

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

El peso corporal y la ingesta calórica fueron cuidadosamente monitoreados en los tres grupos dietarios a lo largo del período experimental. La **Tabla 4** muestra el peso corporal (en gramos) al inicio y al final de la experiencia, y la ingesta calórica (kJ/día) de las ratas alimentadas con las distintas dietas experimentales. Como puede observarse, las diferentes dietas fueron aceptadas y asimiladas por los animales en forma adecuada.

Los cambios en el peso corporal generalmente se correlacionan con la ingesta calórica. Los animales alimentados con DRS mostraron un incremento de peso corporal al cabo de los 6 meses de ingesta que se correlacionaron con una mayor ingesta calórica. Estos cambios se mantuvieron hasta finalizar el tiempo de ingesta (8 meses), y corroboran datos anteriormente publicados (Chicco y col., 2000; Soria y col., 2001; Chicco y col., 2003; Pighin y col., 2003).

Durante los últimos 2 meses de experimentación el grupo DRS + AHB presentó una moderada reducción en el peso corporal respecto al lote alimentado con DRS sin llegar a ser significativa. Sin embargo la ganancia del peso corporal a partir de los 6 meses en el lote DRS+AHB fue significativamente menor que la observada en los otros dos grupos dietarios. La ingesta calórica fue similar en el lote DRS y DRS+AHB.



**Tabla 4.** Peso corporal, ingesta calórica y ganancia de peso de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>

<b>Dieta</b>	<b>DC (n=8)</b>	<b>DRS (n=16)</b>	
Peso corporal inicial (g)	<b>195,8 ± 6,3<sup>a</sup></b>	<b>192,3 ± 5,8<sup>a</sup></b>	
Peso corporal 6 meses (g)	<b>439,1 ± 16,1<sup>b</sup></b>	<b>484,9 ± 13,4<sup>a</sup></b>	
Ingesta calórica (0 a 6 meses) (kJ/día)	<b>279,1 ± 16,2<sup>b</sup></b>	<b>344,8 ± 19,3<sup>a</sup></b>	

<b>Dieta</b>	<b>DC (n=8)</b>	<b>DRS (n=8)</b>	<b>DRS+AHB (n=8)</b>
Peso corporal 8 meses (g)	<b>469,1 ± 13,9<sup>b</sup></b>	<b>527,8 ± 12,8<sup>a</sup></b>	<b>506,2 ± 10,1<sup>a</sup></b>
Ganancia Peso (6 a 8 meses) (g)	<b>31,5 ± 5,6<sup>a</sup></b>	<b>38,7 ± 4,1<sup>a</sup></b>	<b>18,5 ± 3,9<sup>b</sup></b>
Ingesta calórica (6 a 8 meses) (kJ/día)	<b>268,7 ± 17,2<sup>b</sup></b>	<b>367,8 ± 20,7<sup>a</sup></b>	<b>332,5 ± 12,8<sup>a</sup></b>

<sup>1</sup> Los valores se expresan como media ± SEM. Los números entre paréntesis indican el número de animales utilizados en cada grupo experimental. Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

El grupo DRS + AHB consumió DRS durante 6 meses (fuente grasa aceite de maíz AM), sustituyéndose parcialmente AM por AHB durante los últimos 2 meses de experimentación.



## **1.2. Metabolitos, niveles de insulina y leptina plasmáticos y sensibilidad insulínica periférica global**

En la **Tabla 5** se observa, al final del período experimental, un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en los niveles plasmáticos de triglicéridos, ácidos grasos no esterificados (AGNE), colesterol total y glucosa, y un decrecimiento de los niveles de leptina sin modificaciones de la insulinemia en ratas alimentadas crónicamente con DRS comparadas con las del grupo DC. Además, la velocidad de infusión de glucosa (VIG) como medida de la sensibilidad insulínica periférica global es significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en el grupo alimentado con DRS. La sustitución parcial de AM por AHB normalizó todos los parámetros antes mencionados (**Tabla 5**). Estos resultados corroboran los obtenidos por trabajos previos del grupo (Pighin y col., 2003; Rossi y col., 2005; D'Alessandro y col., 2008; Hein y col., 2010).

## **1.3. Peso del tejido adiposo, volumen, número de células y contenido de triglicéridos**

El aumento del peso corporal y de la ingesta energética constatado en los animales alimentados con DRS, se acompaña al final del período experimental con un incremento ( $p < 0,05$ ) del peso de los tejidos adiposo epididimal y retroperitoneal tanto absoluto como relativo (**Tabla 6**). La administración de AHB disminuyó sensiblemente ( $p < 0,05$ ) el peso de ambos tejidos sin alcanzar aún los valores obtenidos en el grupo control.

Además, en la **Tabla 6** se observa que el volumen de los adipocitos del tejido adiposo epididimal así como su contenido en triglicéridos es significativamente superior en el grupo DRS respecto al grupo control (DC). El número de células adiposas expresadas por gramo de tejido en el grupo DRS es significativamente menor ( $p < 0,05$ ), pero sin cambios en el número total de células cuando se expresa como órgano total [media  $\pm$  SEM (n=6): DC:  $34,02 \pm 1,85$ ; DRS:  $35,82 \pm 2,07$ ]. Estos resultados demuestran una hipertrofia de las células adiposas en este grupo experimental.

La presencia del AHB en la dieta disminuyó significativamente el tamaño de los adipocitos observándose un menor volumen celular y un menor contenido de triglicéridos sin



cambios en el número total de células [media  $\pm$  SEM (n=6): DRS+AHB: 32,86  $\pm$  2,11]. El peso total del tejido adiposo epididimal se redujo respecto al grupo DRS. Sin embargo, todos los parámetros analizados fueron aún significativamente mayores a los observados en el lote alimentado con DC.

**Tabla 5.** Niveles de metabolitos, insulina y leptina plasmática y sensibilidad insulínica periférica global (VIG) en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>

	DC	DRS	DRS+AHB
Glucosa (mM)	6,4 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	8,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	6,6 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
Colesterol total (mM)	2,02 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	3,65 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	2,15 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>
Triglicéridos (mM)	1,0 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	2,3 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
AGNE ( $\mu$ M)	294 $\pm$ 17 <sup>b</sup>	887 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	280 $\pm$ 38 <sup>b</sup>
Leptina (ng/ml)	14,6 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	8,0 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	13,7 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
Insulina (pM)	375 $\pm$ 30 <sup>a</sup>	369 $\pm$ 33 <sup>a</sup>	370 $\pm$ 27 <sup>a</sup>
VIG (mg/Kg x min <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	12,0 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	5,1 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	12,3 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM, al menos 6 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes (p<0,05) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

<sup>2</sup> VIG: velocidad de infusión de glucosa.



**Tabla 6.** Peso del tejido adiposo, volumen, número de células y contenido de triglicéridos en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>

	DC	DRS	DRS + AHB
<b>Grasa epididimal</b>			
Peso total (g)	9,8 ± 0,4 <sup>c</sup>	18,3 ± 1,0 <sup>a</sup>	13,3 ± 0,7 <sup>b</sup>
Peso relativo (g/100g peso corporal)	2,1 ± 0,2 <sup>c</sup>	3,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>b</sup>
Volumen celular (pl)	274 ± 15 <sup>c</sup>	562 ± 30 <sup>a</sup>	376 ± 20 <sup>b</sup>
n° células (x 10 <sup>6</sup> /g tejido)	3,5 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,15 <sup>c</sup>	2,5 ± 0,10 <sup>b</sup>
Triglicéridos (μmol/célula)	0,29 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,84 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,08 <sup>b</sup>
<b>Grasa retroperitoneal</b>			
Peso total (g)	8,2 ± 0,5 <sup>c</sup>	16,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	10,4 ± 0,9 <sup>b</sup>
Peso relativo (g/100g peso corporal)	1,8 ± 0,1 <sup>c</sup>	2,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,1 <sup>b</sup>

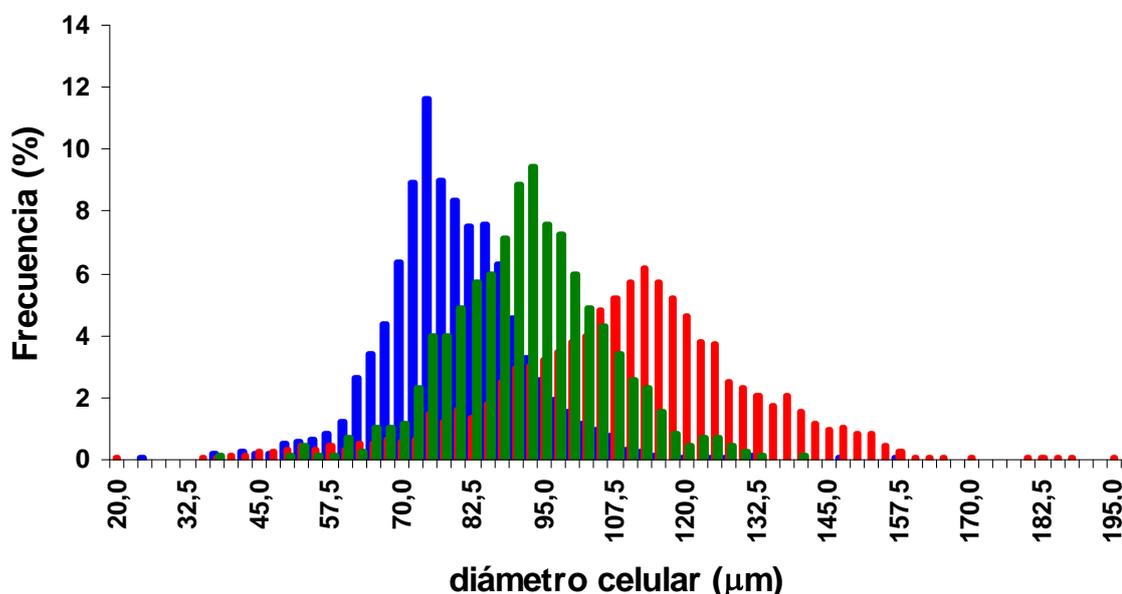
<sup>1</sup> Los valores se expresan como media ± SEM, al menos 6 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ), cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

#### 1.4. Histograma de distribución de diámetros celulares

La **Figura 5** muestra el histograma de frecuencia de los diámetros celulares del tejido adiposo epididimal (con intervalos de 2,5  $\mu\text{m}$ ) en los distintos grupos experimentales al final del período de ingesta.

Los diámetros de los adipocitos se distribuyen en forma gaussiana en los tres grupos dietarios estudiados, aunque se observaron poblaciones diferentes para cada uno de ellos. En el grupo DRS existe un claro desplazamiento de los diámetros celulares hacia la derecha con un incremento significativo del diámetro celular medio y una mayor heterogeneidad de la población celular comparado con los animales que recibieron la dieta DC. La administración de AHB como fuente principal de grasa dietaria condujo a una significativa reducción del diámetro celular medio, con un histograma de distribución celular que se aproxima al del grupo DC.

**Figura 5.** Histograma de distribución promedio de los diámetros de adipocitos epididimales aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Las columnas representan el porcentaje promedio de células medidas que corresponden al intervalo de clase indicado. Se procesaron al menos 6 animales en cada uno de los grupos experimentales.



Estos resultados, sumado a los observados en trabajos previos (Chicco y col., 2003; Lombardo y col., 2007) corroboran que la administración crónica de una DRS induce dislipemia, moderada hiperglucemia, normoinsulinemia y resistencia insulínica periférica global. Estas alteraciones se acompañan de un moderado incremento del peso corporal que se correlaciona con adiposidad visceral, hipertrofia de los adipocitos (tejido epididimal) y alterada distribución celular. Una significativa disminución de los niveles plasmáticos de leptina acompañan estas alteraciones.

Sustituyéndose isocalóricamente la fuente de grasa dietaria (aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao) durante los últimos 2 meses de experimentación se normaliza el perfil lipídico, la moderada hiperglucemia y la resistencia insulínica periférica global, sin experimentar cambios en los niveles plasmáticos de insulina. La adiposidad visceral mejora acompañada de niveles plasmáticos de leptina semejantes a los observados en los animales controles.



## **PARTE II A. ADIPOCITOQUINAS Y ADIPOSIDAD VISCERAL:**

Como observamos anteriormente (Parte I, caracterización del modelo) en los animales alimentados con DRS la adiposidad visceral se acompaña de hipoleptinemia, resistencia insulínica y elevados niveles de AGNE y triglicéridos plasmáticos. En este contexto es posible que un incremento del contenido intracelular de ácidos grasos (mayor lipólisis) así como la continua exposición del tejido adiposo a elevados niveles de AGNE pudieran ser algunos de los mecanismos relacionados con la alterada secreción de leptina. Los AGNE también están involucrados en la resistencia insulínica y esta última se correlaciona con los niveles de adiponectina y del TNF- $\alpha$  (otras adipocitoquinas) que juegan un rol importante en la adiposidad visceral y obesidad. De lo expuesto consideramos importante extender los conocimientos previos analizando en animales alimentados crónicamente (8 meses) con DRS:

- 1) En adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal: a)- la secreción de leptina basal y frente al estímulo de la insulina; b)- el rol del isoproterenol (un  $\beta$ -agonista) y palmitato sobre la secreción de leptina estimulada por la insulina; c)- la correlación entre niveles de leptina basal liberada y el glicerol liberado (como índice de lipólisis).
- 2) La relación entre el contenido de leptina en el tejido adiposo epididimal, lo cual refleja la cantidad de leptina preformada almacenada, y el tamaño de dicho tejido.
- 3) Relación de los niveles plasmáticos de adiponectina, AGNE y resistencia insulínica periférica global (VIG).
- 4) Contenido de TNF- $\alpha$  en tejido adiposo epididimal y su relación con la adiposidad visceral y resistencia insulínica.

Considerando la acción hipolipemiante de AHB previamente descrita analizamos el efecto de la sustitución parcial de la grasa dietaria (AM por AHB) en los animales alimentados con DRS sobre los parámetros antes mencionados.



Para lograr estos objetivos se utilizaron tres grupos experimentales: DC, DRS y DRS + AHB. Más detalles de los grupos de animales y componentes de las dietas fueron descriptos en “Materiales y métodos”.

Los resultados alcanzados fueron los siguientes:

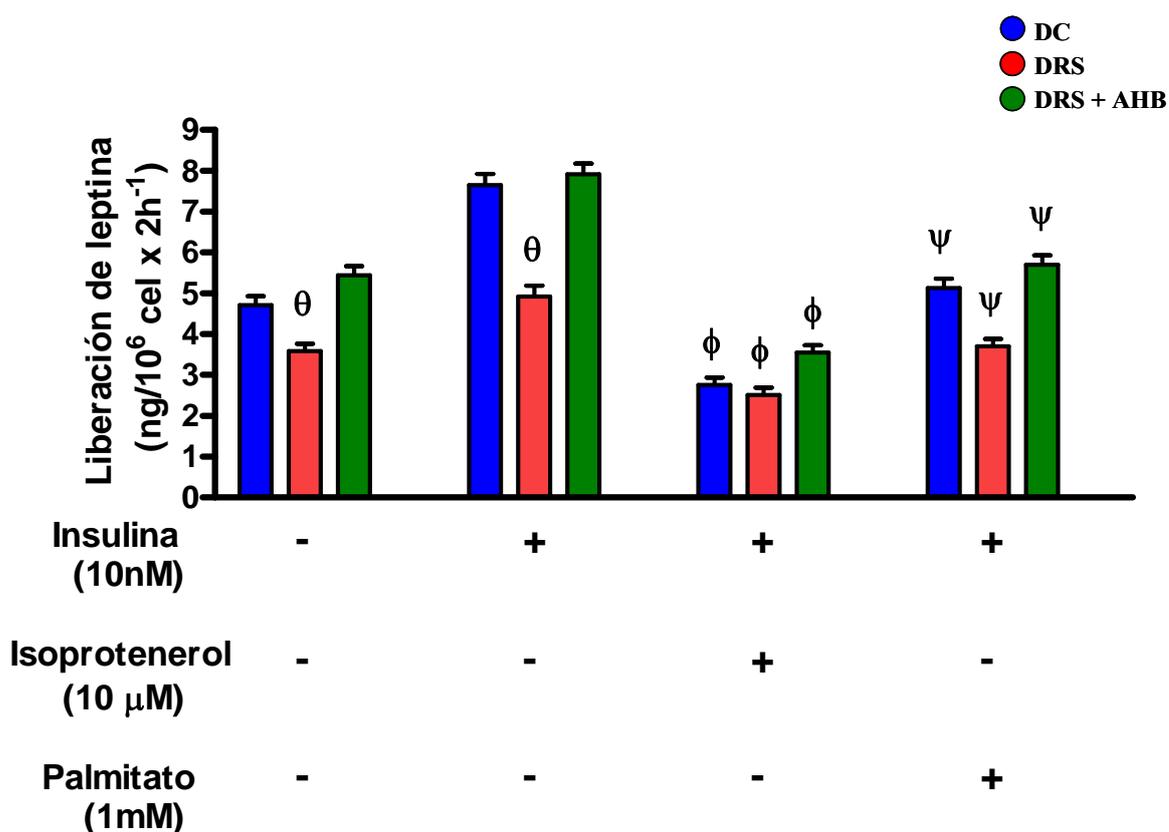
### **2.1. Efecto de la insulina, isoproterenol y ácido palmítico en la secreción de leptina en adipocitos aislados**

La **Figura 6** muestra que, en ausencia de insulina, la cantidad de leptina liberada en los adipocitos aislados de las ratas alimentadas con DRS es significativamente menor ( $p < 0,05$ ) comparada con la de las ratas alimentadas con DC. Como era de esperar la adición de insulina (10 nM) al medio de incubación estimula significativamente la secreción de leptina ( $p < 0,05$ ) en el grupo de ratas alimentadas con DC. Los adipocitos de las ratas alimentadas con DRS también fueron sensibles al efecto estimulador de la insulina. Sin embargo, aunque la cantidad de leptina expresada como valor absoluto fue significativamente menor en este grupo dietario (DRS), el incremento de leptina liberada sobre el valor basal ante el estímulo de la hormona fue similar al observado en los animales alimentados con DC (aproximadamente un 60%). El agregado de AHB en los animales alimentados con DRS incrementa los valores de leptina liberada, tanto en presencia como en ausencia de la hormona, llegando a valores similares a los observados para el grupo control (DC) (**Figura 6**).

En las ratas alimentadas con DRS, la menor secreción de leptina observada podría estar metabólicamente asociada a la elevada lipólisis. En consecuencia, los adipocitos fueron incubados con insulina en presencia de 10  $\mu$ M de isoproterenol ( $\beta$ -agonista) o 1 mM de ácido palmítico. El isoproterenol disminuye significativamente la secreción de leptina en todos los grupos dietarios. Los valores absolutos de leptina liberada fueron similares en todos los grupos experimentales. Sin embargo, el porcentaje de inhibición en la secreción de leptina fue diferente si cada grupo dietario es comparado con el valor obtenido luego del estímulo con insulina. Así, la liberación de leptina se reduce en casi 3 y poco más de 2 veces en los adipocitos de ratas alimentadas con DC y DRS+AHB, respectivamente. Mientras que estos valores se redujeron solo a la mitad en las ratas alimentadas con DRS. Por otro lado, el

palmitato mimetiza el efecto inhibitorio del isoproterenol sobre la liberación de leptina frente al estímulo con insulina (**Figura 6**).

**Figura 6.** Efectos de la insulina, isoproterenol y ácido palmítico sobre la liberación de leptina en adipocitos aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>

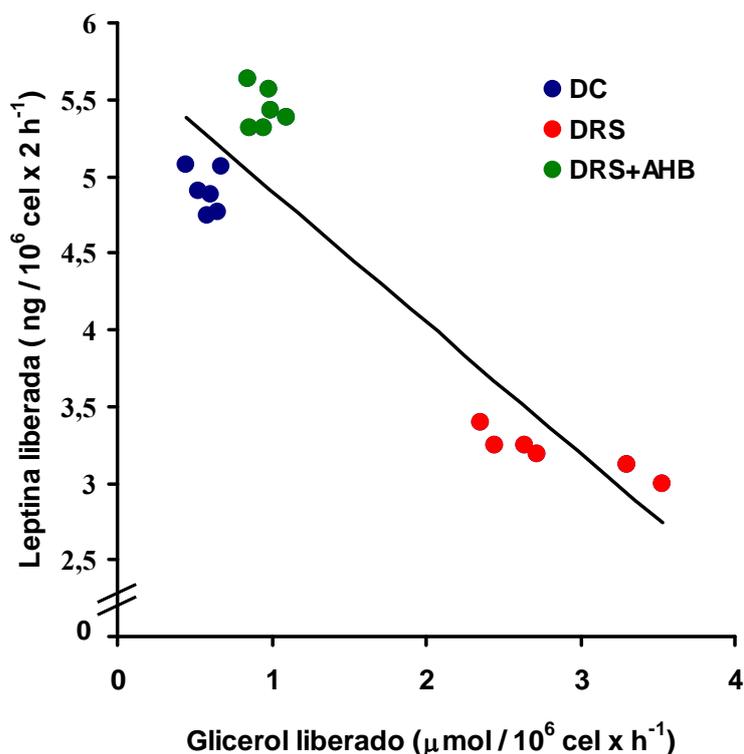


<sup>1</sup> Los valores se expresan como media ± SEM (n=6). Los adipocitos fueron incubados en presencia o ausencia de insulina (10 nM), isoproterenol (10 μM) y palmitato (1 mM) como se describe en Materiales y métodos. θ p<0,05 DRS vs DC y DRS+AHB. Φ p<0,05 DC, DRS y DRS+AHB en presencia de insulina e isoproterenol vs DC, DRS y DRS+AHB respectivamente incubado solamente con insulina. Ψ p<0,05 DC, DRS y DRS+AHB en presencia de insulina y palmitato vs DC, DRS y DRS+AHB respectivamente incubado solamente con insulina.

## 2.2. Correlación entre el glicerol basal liberado y la leptina liberada

La **Figura 7** muestra la elevada correlación negativa ( $r^2=0,775$ ;  $p<0,01$ ) entre el glicerol liberado basal (como un índice de lipólisis) y la leptina liberada. En los adipocitos hipertrofiados de las ratas alimentadas con DRS, el glicerol liberado bajo condiciones basales es significativamente mayor comparado con el glicerol liberado de los animales alimentados con DC, mientras que la leptina liberada es significativamente menor. Cuando la fuente de grasa (aceite de maíz) es reemplazada por AHB en el grupo DRS durante los 2 últimos meses del periodo experimental, tanto el glicerol basal liberado como la leptina basal liberada alcanzan valores similares a los encontrados en los animales alimentados con DC.

**Figura 7.** Correlación entre leptina basal liberada y glicerol basal liberado en adipocitos aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Se incluyeron 6 animales en cada grupo experimental. La leptina liberada se correlaciona negativamente con la lipólisis basal (glicerol liberado) en la célula adiposa ( $n=18$ ,  $r^2=0,775$ ;  $p<0,01$ ).

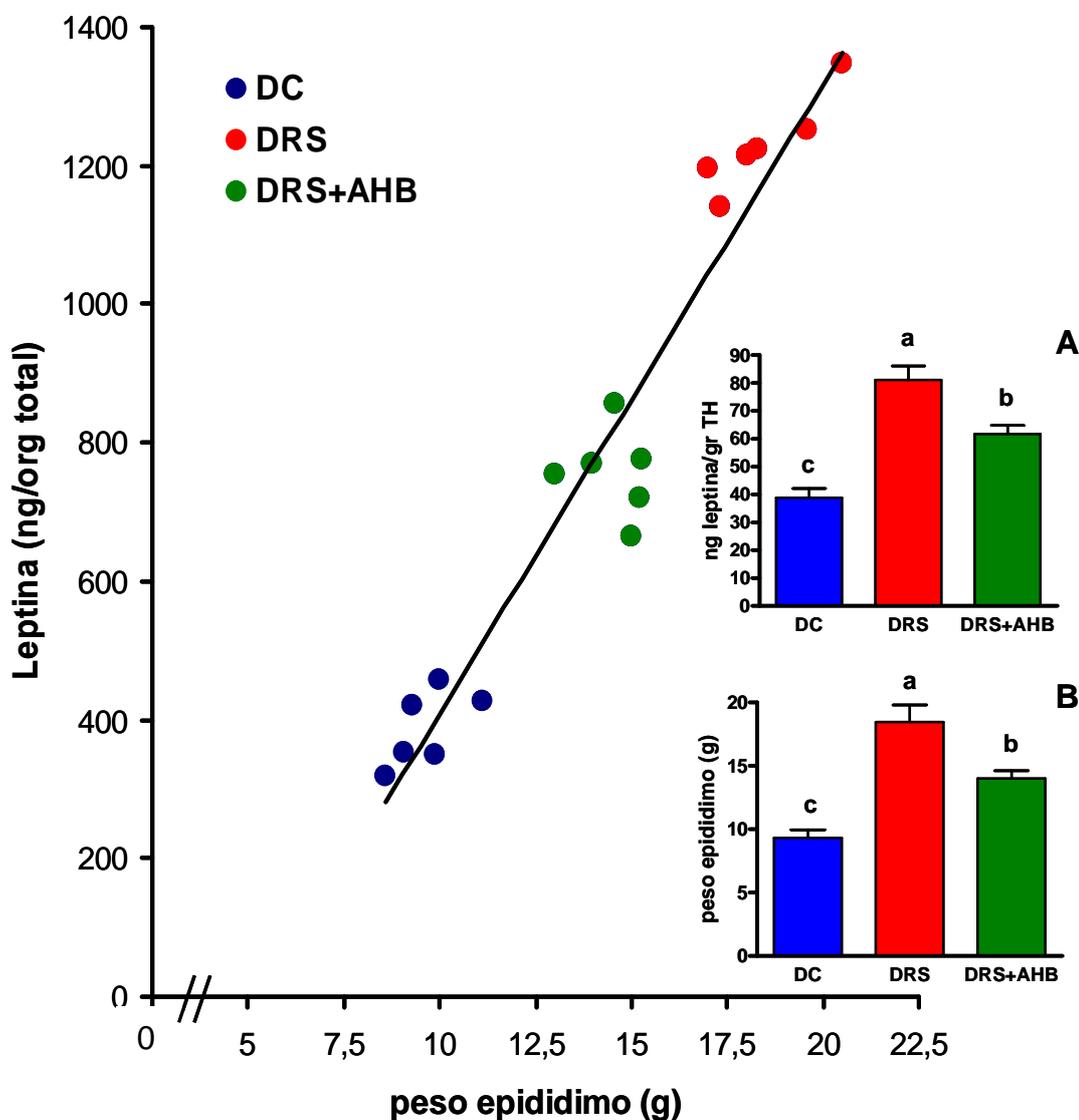


### **2.3. Correlación entre el contenido de leptina y el peso del tejido adiposo epididimal**

La **Figura 8** describe la elevada correlación positiva ( $r^2=0.948$ ,  $p<0,001$ ) entre el contenido de leptina total en tejido adiposo y el peso del tejido adiposo epididimal en los 3 grupos dietarios. Los resultados muestran que, en las ratas alimentadas con DRS, el incremento de la concentración de leptina en el tejido adiposo epididimal se correlaciona con el incremento de la masa grasa. La administración de AHB en el grupo DRS reduce significativamente el peso del tejido adiposo así como también el contenido de leptina, aunque los valores obtenidos están todavía por encima de aquellos encontrados en el grupo que recibió DC.

Las Figuras insertas A y B describen la media  $\pm$  SEM del contenido de leptina por gramo de tejido húmedo y el peso del tejido adiposo epididimal en los tres grupos dietarios respectivamente.

**Figura 8.** Correlación entre el contenido de leptina en tejido adiposo epididimal y el peso del tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>

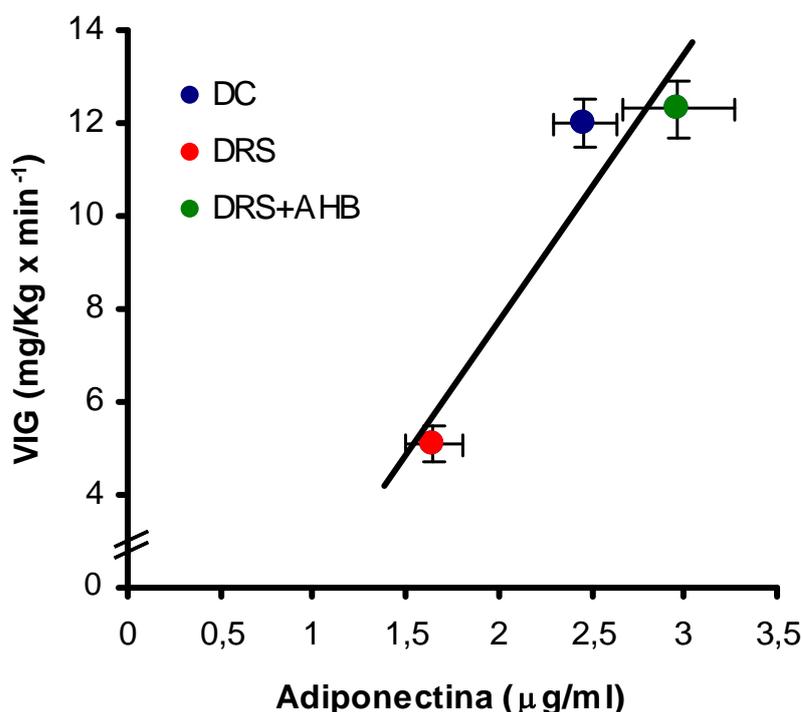


<sup>1</sup> Se incluyeron 6 animales en cada grupo experimental. La leptina liberada se correlaciona positivamente con el peso del tejido adiposo epididimal (n=18,  $r^2=0,948$ ,  $p<0,001$ ). El contenido de leptina en el tejido adiposo (A) y el peso del tejido adiposo epididimal (B) de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB se expresan como media  $\pm$  SEM. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ( $p<0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

#### 2.4. Correlación entre los niveles de adiponectina plasmática y sensibilidad insulínica periférica global

Resultados previos demostraron una significativa disminución de los niveles plasmáticos de adiponectina en los animales alimentados con DRS que se normalizaron con la administración de AHB. Los presentes datos corroboran e incrementan estos hallazgos observándose una elevada correlación positiva ( $r^2=0,774$   $n=18$ ;  $p<0,01$ ) entre los niveles plasmáticos de adiponectina y la sensibilidad insulínica periférica global (VIG) (clamp euglicémica-hiperinsulinémica) en los 3 grupos experimentales (**Figura 9**).

**Figura 9.** Correlación entre los niveles plasmáticos de adiponectina y la sensibilidad insulínica periférica global de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>

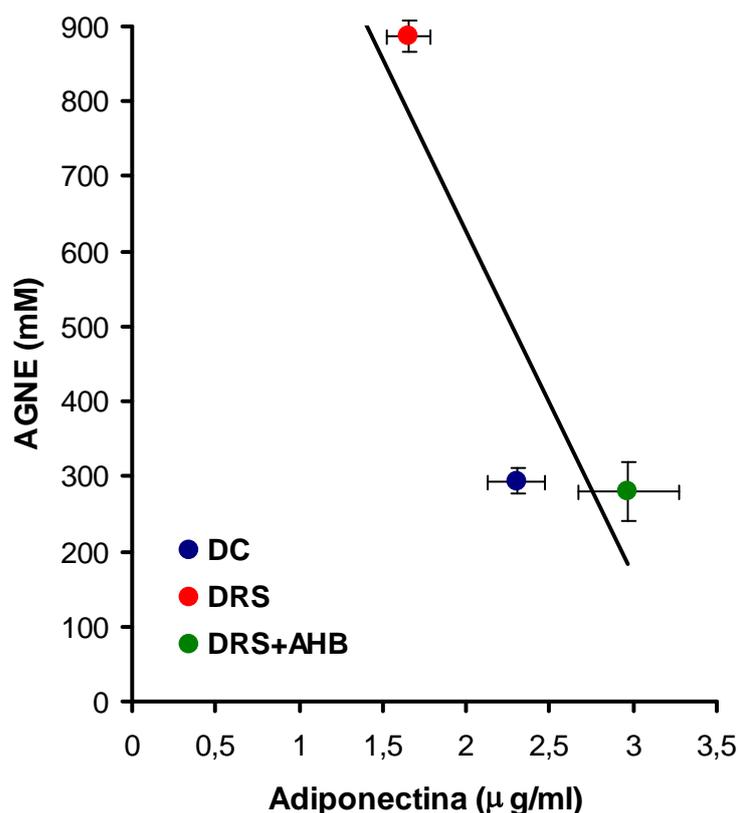


<sup>1</sup> Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM, donde 6 animales se incluyeron en cada grupo experimental. La adiponectina plasmática se correlaciona positivamente con la sensibilidad insulínica periférica global ( $n=18$ ,  $r^2=0,774$ ;  $p<0,01$ ).

## 2.5. Correlación entre los niveles plasmáticos de AGNE y adiponectina

La **Figura 10** muestra la elevada correlación negativa ( $r^2=0,759$ ;  $p<0,01$ ) que existe entre los niveles de adiponectina y los AGNEs plasmáticos en los tres grupos dietarios. En las ratas alimentadas con DRS la disminución en los niveles plasmáticos de adiponectina se correlaciona con un incremento de los AGNEs plasmáticos. La sustitución parcial de AM por AHB normaliza los niveles plasmáticos de adiponectina y AGNEs.

**Figura 10.** Correlación entre los niveles plasmáticos de adiponectina y los AGNEs de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>

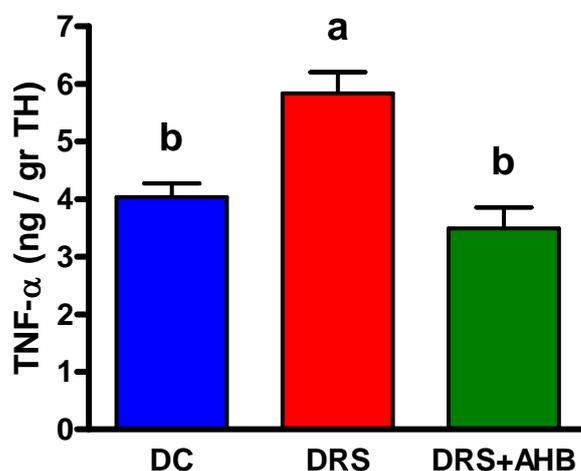


<sup>1</sup> Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM, donde 6 animales se incluyeron en cada grupo experimental. La adiponectina plasmática se correlaciona negativamente con los AGNEs ( $n=18$ ,  $r^2=0,759$ ,  $p<0,01$ ).

## 2.6. Contenido del factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) en tejido adiposo epididimal

La **Figura 11** muestra el contenido de TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo epididimal al final del periodo de ingesta en los tres grupos experimentales. Se puede observar que el contenido de TNF- $\alpha$  en dicho tejido se incrementa significativamente ( $p < 0,05$ ) en el grupo alimentado con DRS respecto del grupo que recibió DC. La sustitución parcial de AM por AHB dietario en el grupo DRS durante los últimos 2 meses del periodo experimental disminuye significativamente ( $p < 0,05$ ) el contenido de TNF- $\alpha$  alcanzando niveles similares a los observados en el grupo DC (**Figura 11**). Resultados similares se observan cuando el contenido de TNF- $\alpha$  es expresado en ng/órgano total (los valores se expresan como media  $\pm$  SEM,  $n = 6$ ): DC:  $34,0 \pm 3,4$ ; DRS:  $72,6 \pm 10,0$ ; DRS+AHB:  $40,4 \pm 3,8$ .

**Figura 11.** Contenido de TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>

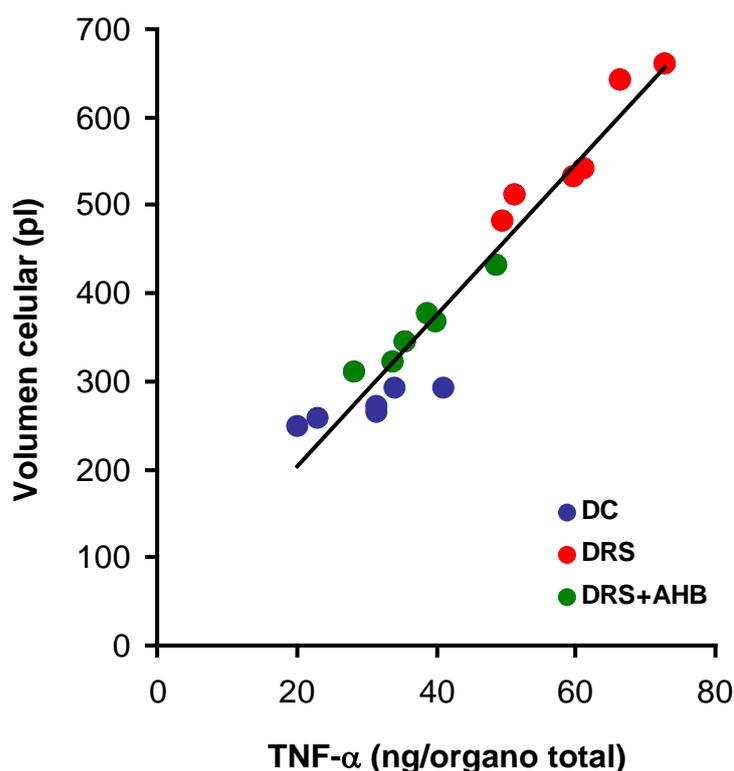


<sup>1</sup> Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando la variable es comparada con el test de Newman Keuls.

## 2.7. Correlación entre el contenido de TNF- $\alpha$ en tejido adiposo epididimal y el volumen celular de adipocitos aislados

La **Figura 12** describe la elevada correlación positiva ( $r^2=0,9324$ ,  $p<0,001$ ) entre el contenido de TNF- $\alpha$  en tejido adiposo y el volumen celular de los adipocitos aislados en los 3 grupos dietarios. Los resultados muestran que, en las ratas alimentadas con DRS, el incremento de la concentración de TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo epididimal se correlaciona con el incremento del volumen celular. La administración de AHB en el grupo DRS reduce significativamente el volumen celular así como también el contenido de TNF- $\alpha$ .

**Figura 12.** Correlación entre el contenido de TNF- $\alpha$  en tejido adiposo epididimal y el volumen celular de los adipocitos de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Se incluyeron 6 animales en cada grupo experimental. El contenido de TNF- $\alpha$  se correlaciona positivamente con el volumen celular de los adipocitos aislados ( $n=18$ ,  $r^2=0,9324$ ,  $p<0,001$ ).

## PARTE II B.

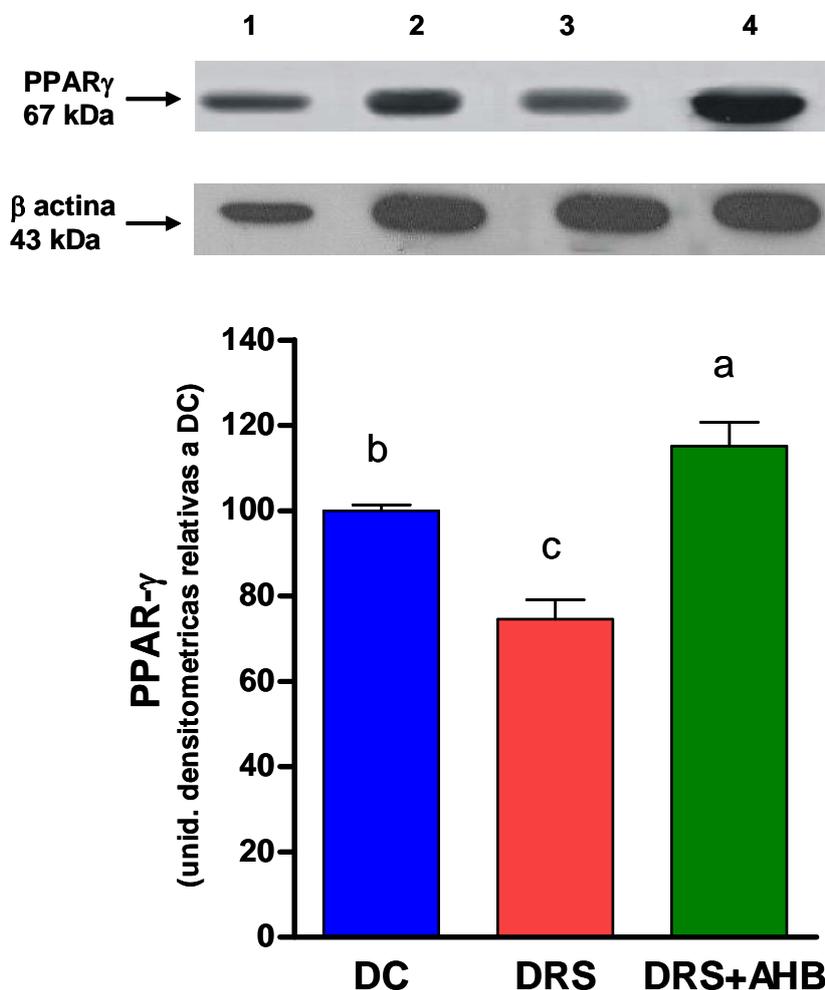
### 2.8. Determinación de la expresión de la masa proteica del receptor activador de la proliferación peroxisomal $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ ) en tejido adiposo epididimal

Se ha sugerido que el PPAR- $\gamma$  en el tejido adiposo sería un mediador importante en el mantenimiento de la sensibilidad insulínica periférica global protegiendo a los tejidos no adiposos de la lipotoxicidad y regulando la producción de adipocitoquinas tales como la leptina y adiponectina.

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta el presente, nos interesó analizar el efecto que tiene la DRS y la sustitución parcial en la misma de la fuente de grasa dietaria AM por AHB sobre la expresión de la masa proteica del PPAR- $\gamma$ .

El inmunoblot del tejido adiposo revela una sola banda de 67 kDa consistente con el PPAR- $\gamma$ . Luego del análisis densitométrico el contenido de PPAR- $\gamma$  del grupo DC fue normalizado a 100% y los valores de DRS y DRS+AHB fueron expresados como el porcentaje relativo a DC. Cualitativa y cuantitativamente el análisis de Western blot muestra que la abundancia relativa del PPAR- $\gamma$  es significativamente menor en los animales alimentados con DRS respecto al grupo que recibió DC. La abundancia relativa de la masa proteica del PPAR- $\gamma$  en el grupo que recibió DRS+AHB se incrementó significativamente cuando se lo comparó tanto con el grupo DC como con el DRS (**Figura 13**).

**Figura 13.** Expresión de la masa proteica del PPAR- $\gamma$  en el tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>



<sup>1</sup> *Panel superior:* Inmunoblot del PPAR- $\gamma$  y  $\beta$ -actina del tejido adiposo de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB. El marcador molecular se indica a la izquierda; *Línea 1:* extracto de músculo esquelético, utilizado como control positivo; *Línea 2:* DC; *Línea 3:* DRS; *Línea 4:* DRS+AHB.

*Panel inferior:* Análisis densitométrico de la expresión de la masa proteica del PPAR- $\gamma$  en el tejido adiposo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM (n = 6) relativos a DC. Los valores de masa proteica del PPAR- $\gamma$  fueron corregidos por los niveles de  $\beta$ -actina presentes en cada una de las muestras. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes (p<0,05) cuando la variable es comparada con el test de Newman Keuls.

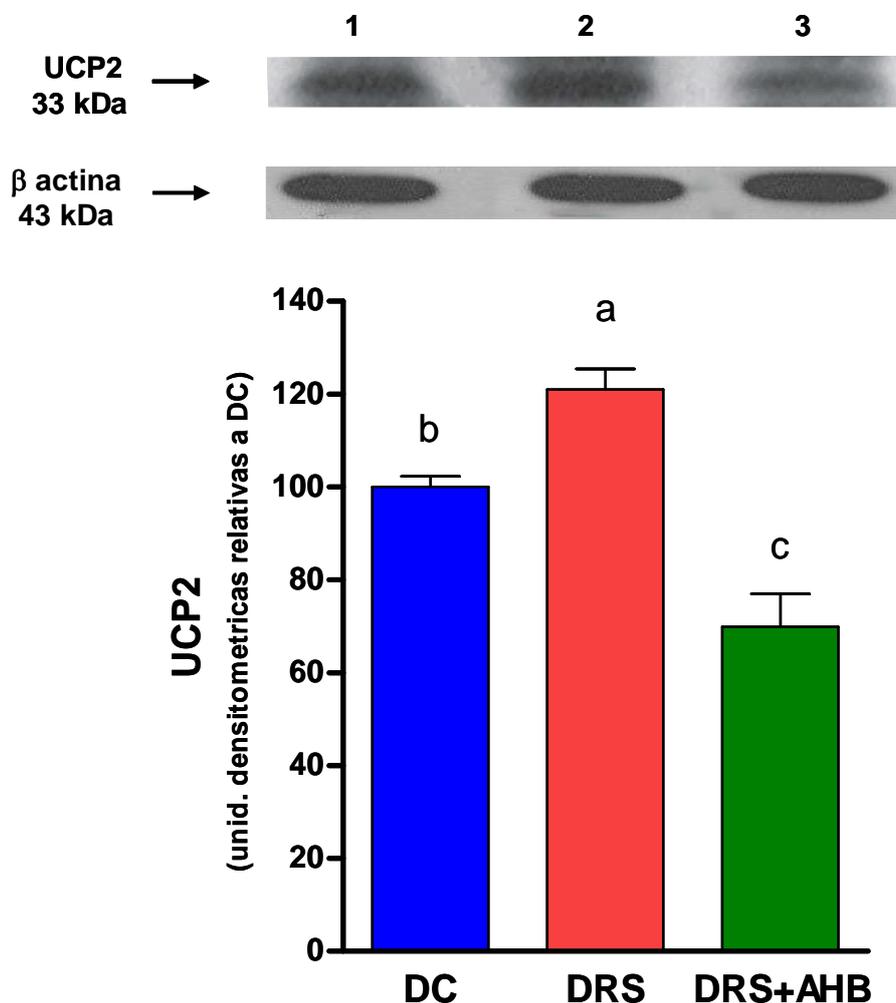


## **2.9. Determinación de la expresión de la masa proteica de la proteína desacoplante 2 (UCP2) en tejido adiposo epididimal**

La UCP2 juega un rol potencial en regular el gasto energético contribuyendo a la obesidad y a la diabetes tipo 2. La presencia de adiposidad y los altos niveles de lípidos plasmáticos inducidos por la DRS podrían modificar la expresión de esta proteína desacoplante. Por lo tanto nos interesó analizar la expresión de la masa proteica de la UCP2 en los animales alimentados con DRS y el efecto de la administración de n-3 PUFAs dietarios sobre dicho parámetro.

El inmunoblot del tejido adiposo revela una sola banda de 33 kDa consistente con la UCP2. Luego del análisis densitométrico el contenido de UCP2 del grupo DC fue normalizado a 100% y los valores de DRS y DRS+AHB fueron expresados como el porcentaje relativo a DC. Cualitativa y cuantitativamente el análisis de Western blot muestra que la abundancia relativa de la UCP2 incrementa significativamente en los animales alimentados con DRS respecto al grupo que recibió DC. La abundancia relativa de la misma en el grupo que recibió DRS+AHB disminuyó significativamente cuando se la comparó tanto con el grupo DC como con el DRS (**Figura 14**).

**Figura 14.** Expresión de la masa proteica de la UCP2 en el tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>



<sup>1</sup> *Panel superior:* Inmunoblot de la UCP2 y  $\beta$ -actina del tejido adiposo de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB. El marcador molecular se indica a la izquierda; *Línea 1:* DC; *Línea 2:* DRS; *Línea 3:* DRS+AHB.

*Panel inferior:* Análisis densitométrico de la expresión de la masa proteica de la UCP2 en el tejido adiposo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM (n = 6) relativos a DC. Los valores de masa proteica de la UCP2 fueron corregidos por los niveles de  $\beta$ -actina presentes en cada una de las muestras. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando la variable es comparada con el test de Newman Keuls.



---

## **PARTE II C. MARCADORES DEL ESTRÉS OXIDATIVO:**

Los resultados obtenidos al presente sugieren una desregulación funcional del adipocito en los animales alimentados con DRS observado por: incremento de la lipólisis basal, alterada producción de adipocitoquinas y cambios en la expresión de la masa proteica del PPAR- $\gamma$  y de la proteína desacoplante UCP2. Entre otros factores implicados en esta desregulación funcional del tejido adiposo hipertrofiado, el estrés oxidativo podría jugar un rol importante. De acuerdo a lo expuesto analizamos:

- 1) a)- Actividad de la enzima oxidante xantino oxidoreductasa; b)- actividades de las enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa); c)- contenido de glutatión y especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBA)
  
- 2) Los posibles efectos de la sustitución parcial del aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao, como fuente de grasa dietaria, sobre los parámetros anteriormente mencionados

Para lograr estos objetivos se utilizaron tres grupos experimentales: DC, DRS y DRS + AHB. Más detalles de los grupos de animales y componentes de las dietas fueron descriptos en el capítulo “Materiales y métodos”.

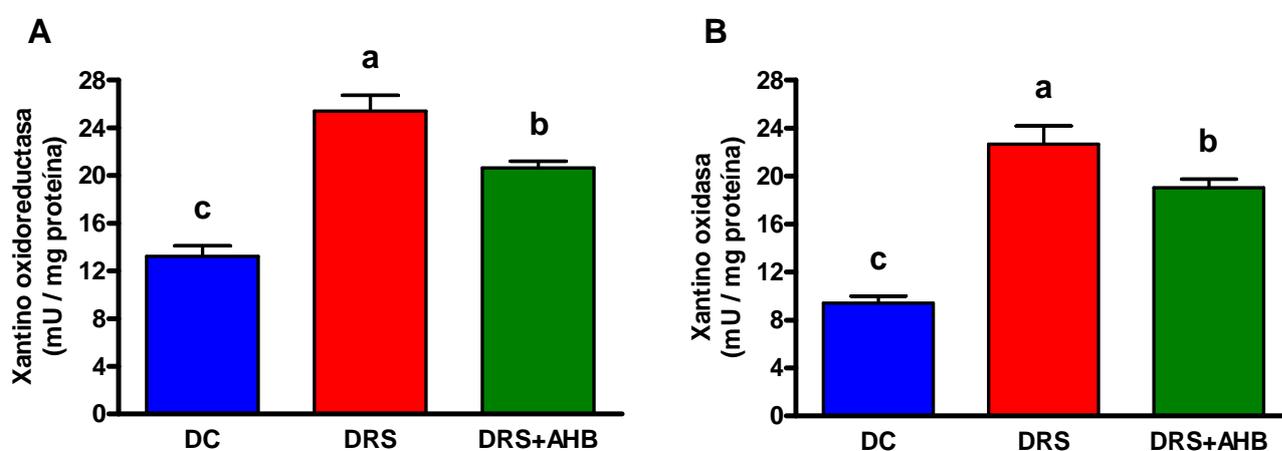
Los resultados alcanzados fueron los siguientes:

## 2.10. Enzima oxidante xantino oxidoreductasa

La actividad de la enzima xantina oxidoreductasa en el tejido adiposo epididimal se incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) en el grupo alimentado con DRS respecto del grupo que recibió DC. La sustitución parcial de AM por AHB dietario en el grupo DRS durante los últimos 2 meses del periodo experimental disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) la actividad de dicha enzima, sin alcanzar los valores observados en el grupo DC (**Figura 15 A**).

El comportamiento de la actividad de la enzima xantino oxidasa es similar al observado para la actividad de la enzima xantino oxidoreductasa (**Figura 15 B**).

**Figura 15.** Actividad enzimática de la xantino oxidoreductasa (**A**) y xantino oxidasa (**B**) en tejido adiposo epididimal de de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>



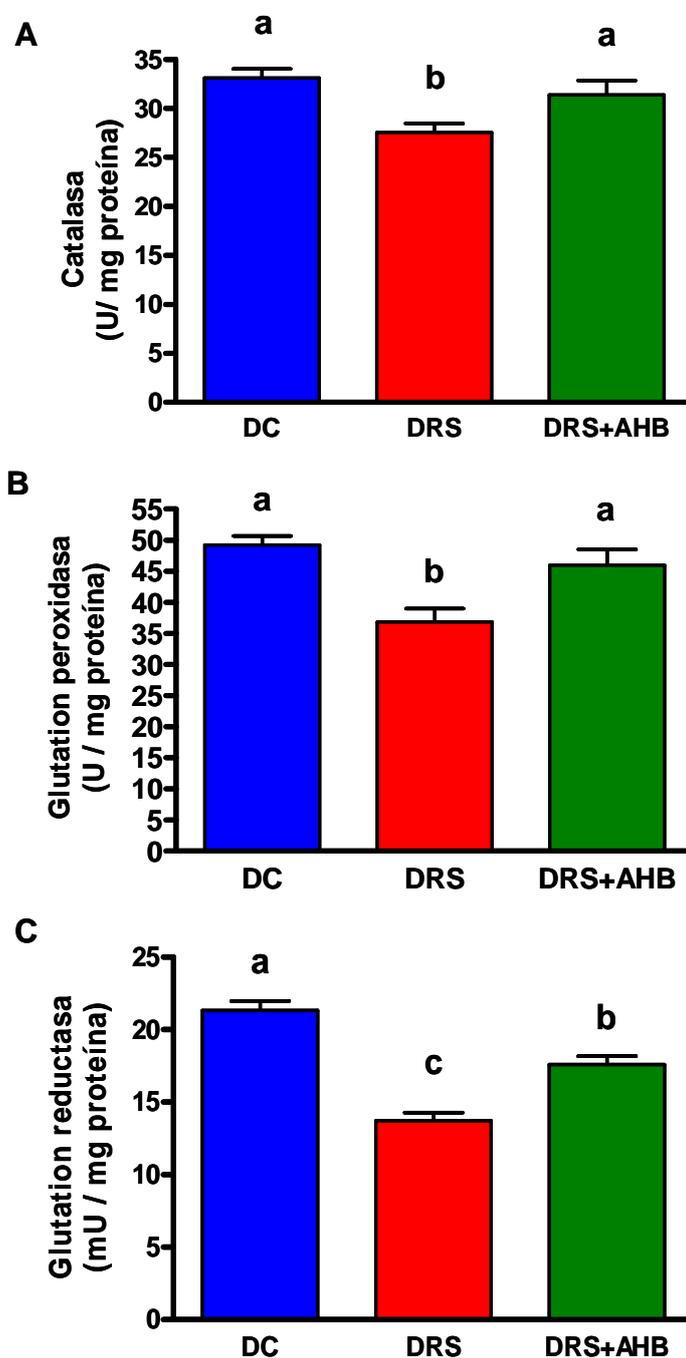
<sup>1</sup> Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.



### **2.11. Determinación de las actividades enzimáticas de la catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa**

En la **Figura 16** se observan las actividades de las enzimas catalasa (**A**), glutatión peroxidasa (**B**) y glutatión reductasa (**C**) en el tejido adiposo epididimal de los tres grupos experimentales. En los animales que recibieron DRS se observa que la actividad de dichas enzimas se redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo que recibió DC. Cuando el AHB sustituyó parcialmente al AM durante los 2 últimos meses de ingesta las actividades de la catalasa y glutatión peroxidasa incrementaron significativamente ( $p < 0,05$ ) respecto del grupo que recibió DRS alcanzando valores que no difieren a los observados en los animales que recibieron DC (**Figura 16 A y B**). Por otro lado, en el grupo DRS+AHB la actividad de la glutatión reductasa también incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) respecto del grupo DRS, sin alcanzar los valores observados en los animales de igual sexo y edad alimentados con DC (**Figura 16 C**).

**Figura 16.** Actividades enzimáticas de la catalasa (A), glutatión peroxidasa (B) y glutatión reductasa (C) en tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM (n = 6). Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

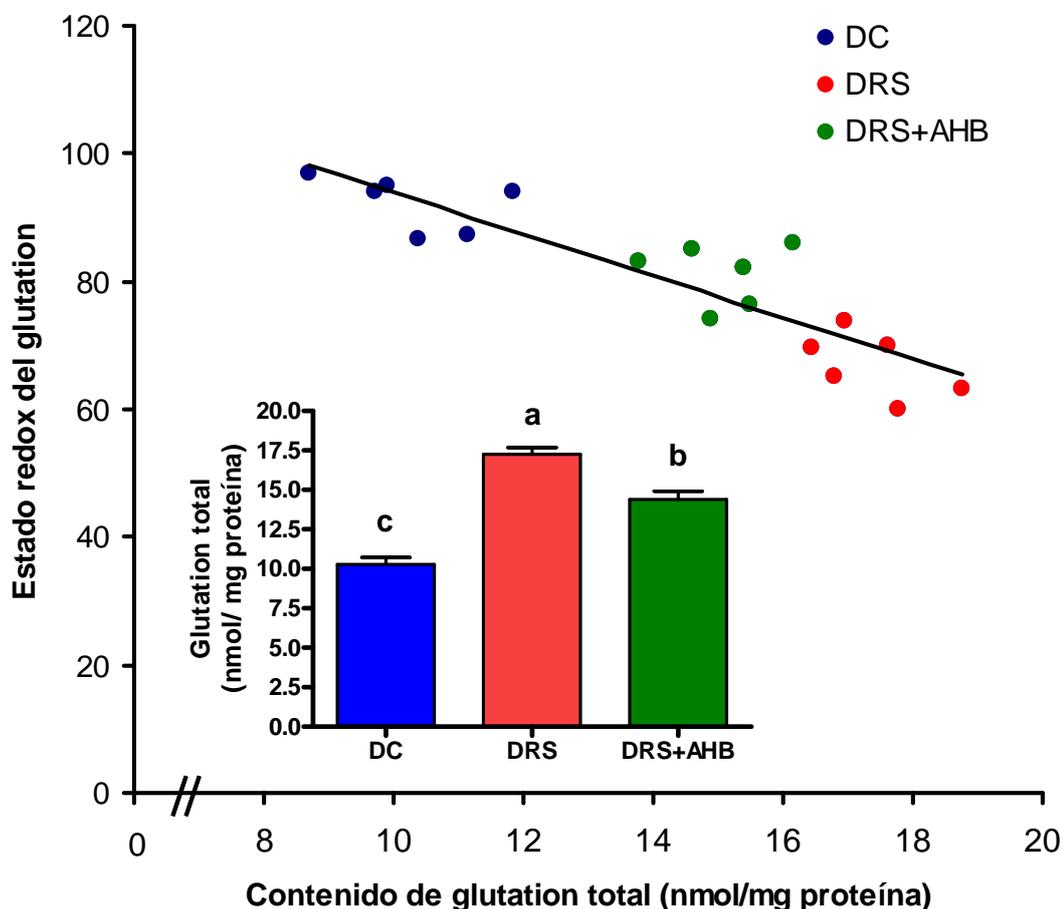


## 2.12. Correlación entre el contenido de glutathion total y el estado redox del glutathion

La **Figura 17** muestra la correlación negativa ( $r^2=0.7746$ ,  $p<0,01$ ) que existe entre el estado redox del glutathion y el contenido de glutathion total en tejido adiposo en los 3 grupos dietarios. El estado redox del glutathion fue calculado como el cociente entre la concentración de la forma oxidada y la concentración total de glutathion por 100, de acuerdo a Galinier y col. (2006a). El glutathion total es la concentración de la forma oxidada más la forma reducida. En las ratas alimentadas con DRS el incremento de la concentración de glutathion total en el tejido adiposo epididimal se correlaciona negativamente con la disminución del estado redox del glutathion. La administración de AHB en el grupo DRS reduce significativamente el contenido de glutathion total e incrementa el estado redox del glutathion, aunque sin alcanzar los valores observados en el grupo que recibió DC.

La Figura inserta muestra la media  $\pm$  SEM del contenido de glutathion total en el tejido adiposo epididimal en los tres grupos dietarios.

**Figura 17.** Correlación entre el contenido de glutatión total y el estado redox del glutatión en tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Se incluyeron 6 animales en cada grupo experimental. El estado redox del glutatión se correlaciona negativamente con el contenido de glutatión total (n=18,  $r^2=0,7746$ ,  $p<0,01$ ). La figura inserta muestra el contenido de glutatión total (media  $\pm$  SEM) en el tejido adiposo de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS+AHB. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ( $p<0,05$ ) cuando la variable es comparada con el test de Newman Keuls



### **2.13. Determinación de la peroxidación de lípidos en tejido adiposo (TBARS)**

La concentración de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico en el tejido adiposo epididimal en los animales alimentados con DRS por un periodo de 8 meses muestra una mayor peroxidación lipídica respecto de los animales de igual sexo y edad que recibieron DC ( $p < 0,05$ ). La sustitución parcial de AM por AHB en la DRS no modifica los niveles de TBARS respecto a los valores observados en el grupo DRS. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (media  $\pm$  SEM,  $n = 6$ ): nmol MDA/(mg proteína x órgano total): DC:  $20,8 \pm 2,9$ ; DRS:  $38,8 \pm 1,4$ ; DRS+AHB:  $42,8 \pm 3,4$ ;  $p < 0,05$  DC vs DRS y DRS+AHB.

# **DISCUSIÓN**



## **DISCUSIÓN:**

En la primer parte de la presente tesis (Parte I) corroboramos que ratas Wistar alimentadas crónicamente con una dieta rica en sacarosa (DRS) desarrollan dislipemia (niveles elevados de triglicéridos y AGNE) y resistencia insulínica (RI), acompañado de una disminución de los niveles plasmáticos de leptina, adiposidad visceral y una alterada distribución celular. Los mecanismos involucrados en la hipoleptinemia en presencia de una importante adiposidad visceral no están aún bien dilucidados. Sin embargo, un exceso de AGNE plasmáticos y tisulares (tejido adiposo) podrían ser partícipes importantes de este mecanismo. Los AGNE también están involucrados en la RI y esta última se correlaciona con los niveles de adiponectina y TNF- $\alpha$ . Con el objeto de analizar estos aspectos examinamos el efecto de la administración crónica de una DRS sobre la modulación de la secreción de leptina del adipocito y del depósito intracelular de esta adipocitoquina en el tejido adiposo. La relación entre los niveles de adiponectina, velocidad de infusión de glucosa (sensibilidad insulínica periférica global) (VIG) y AGNE plasmáticos. El contenido de TNF- $\alpha$  en tejido adiposo y su correlación con la adiposidad visceral. Además, considerando que los n-3 PUFAs normalizan la dislipemia y la sensibilidad insulínica analizamos el efecto de la administración dietaria de los mismos sobre los aspectos antes mencionados.

Los mayores hallazgos de la presente tesis en su Parte II A fueron:

1. En los adipocitos aislados de ratas Wistar alimentadas crónicamente 8 meses con DRS se observa una menor liberación de leptina expresada como valor absoluto, tanto basal como bajo el estímulo de la insulina comparada con la de los animales que recibieron dieta control (DC). Sin embargo la relación entre la leptina liberada luego del estímulo con insulina y los niveles basales de leptina fueron similares en los tres grupos dietarios. La administración de AHB normalizó tanto la liberación de leptina basal como bajo el estímulo de la insulina. El isoproterenol inhibe significativamente la secreción de leptina bajo el estímulo de la insulina en todos los grupos dietarios, pero el porcentaje de inhibición es menor en los animales que recibieron DRS. Por su parte el palmitato mimetiza los efectos inhibitorios del isoproterenol.

2. Los adipocitos aislados de las ratas alimentadas con DRS en condiciones basales muestran una fuerte correlación negativa entre el glicerol liberado (como un índice de lipólisis) y la leptina liberada. Ambos parámetros alcanzan valores similares a los observados en el grupo control luego de la administración de AHB dietario.



3. El contenido de leptina incrementa significativamente en el tejido adiposo epididimal de las ratas alimentadas con DRS y este incremento se correlaciona positivamente con el aumento del peso de dicho tejido. El AHB dietario administrado durante los últimos 2 meses de experimentación redujo el contenido de leptina y el peso del tejido adiposo epididimal, aunque los valores alcanzados todavía son superiores a aquellos encontrados en los animales alimentados con DC.

4. En los animales alimentados con DRS+AHB los niveles de glucemia basal así como la sensibilidad insulínica periférica global alcanzaron valores semejantes a los observados en el grupo DC, sin cambios en los niveles de insulina circulante. Los niveles de adiponectina se correlacionaron positivamente con la VIG y negativamente con los niveles plasmáticos de AGNE.

5. El contenido de TNF- $\alpha$  se incrementa significativamente en el tejido adiposo epididimal de las ratas alimentadas con DRS y este incremento se correlaciona positivamente con el aumento del volumen celular de los adipocitos. El AHB dietario administrado durante los últimos 2 meses de experimentación redujo el contenido de TNF- $\alpha$  y el volumen celular de los adipocitos, aunque los valores alcanzados todavía son superiores a aquellos encontrados en los animales alimentados con DC.

Los niveles plasmáticos de leptina y ácidos grasos libres se modifican recíprocamente con las condiciones nutricionales y fisiológicas. Estudios *in vitro* usando adipocitos aislados de ratas normales han demostrado que la insulina estimula la secreción de leptina, mientras que los  $\beta$ -agonistas y otros agentes activadores de la adenilato ciclasa ejercen un fuerte efecto inhibitorio sobre la secreción de leptina estimulada por insulina y de manera concomitante estimulan la lipólisis y la liberación de ácidos grasos (Cammisotto y Bukowiecki, 2002). Los presentes hallazgos demuestran que el efecto agudo de la insulina, sola y en presencia de isoproterenol o palmitato, sobre la liberación de leptina en adipocitos aislados de ratas alimentadas con DC está en concordancia con el estudio de Cammisotto y Bukowiecki (2002) antes mencionado. Una situación diferente surge de los adipocitos aislados de ratas alimentadas con DRS. En estos animales la cantidad total de leptina liberada, tanto basal como bajo el estímulo de insulina, fue significativamente menor. La mayor liberación del glicerol bajo las condiciones basales indica una lipólisis incrementada. Mas aun, en un trabajo



previo de nuestro grupo (Soria y col., 2002) observamos un incremento significativo del glicerol liberado en la lipólisis estimulada por el isoproterenol en adipocitos de ratas alimentadas crónicamente con DRS cuando se las compara con controles de igual edad alimentados con DC. Así, la fuerte correlación negativa que existe entre los niveles de glicerol y leptina liberados en condiciones basales, observados en este grupo dietario, sugiere que un aumento intracelular de ácidos grasos generados como consecuencia de la elevada lipólisis podría jugar un rol clave en la modulación de la secreción de leptina. Además, la adición de palmitato disminuye significativamente la liberación de leptina estimulada por insulina. En concordancia con nuestros resultados, Cammisotto y col. (2003) demostraron *in vitro* en adipocitos de ratas normales que ácidos grasos de cadena larga y media, independiente del grado de insaturación, suprimen el efecto estimulador de la insulina en la secreción de leptina.

Además del metabolismo de los lípidos, el transporte y metabolismo de la glucosa son factores importantes en la regulación de la expresión y secreción de leptina. Cammisotto y col. (2005) observaron que substratos glicolíticos son necesarios para mantener la secreción de leptina tanto basal como estimulada por insulina. Mueller y col. (1998) demostraron que el incremento en la secreción de leptina estimulada por insulina se relaciona más estrechamente a la cantidad de glucosa captada por los adipocitos que a la concentración de insulina *per se*. Más aun, la inhibición del transporte de glucosa o la fosforilación y la glicólisis causan una supresión en la liberación de leptina en los adipocitos de ratas en cultivo. En adipocitos de ratas alimentadas con DRS hemos demostrado recientemente una reducción substancial de la captación de glucosa bajo el estímulo de la insulina (Rossi y col., 2010). Además, demostramos una disminuida acción antilipolítica de la insulina en los animales alimentados con DRS (Soria y col., 2002). Como mencionáramos anteriormente, la leptina liberada bajo el estímulo de insulina, expresada como valor absoluto, fue significativamente menor en las ratas alimentadas con DRS. Sin embargo, la relación de leptina liberada luego de la estimulación hormonal fue similar a la obtenida en los grupos DC y DRS+AHB. En consecuencia, nuestros datos sugieren que la sensibilidad a la insulina de la vía secretoria de la leptina podría estar involucrada en la disminuida secreción de leptina bajo el estímulo de la insulina en los adipocitos de ratas alimentadas con DRS.



Por otro lado, se han reportado resultados controvertidos (estimulación - inhibición) en relación con los efectos del ácido eicosapentaenoico (EPA) *in vitro* sobre la expresión génica y secreción de leptina (Murata y col., 2000; Reseland y col., 2001). Se ha demostrado que el EPA estimula la expresión del ARNm y la secreción de la leptina en adipocitos 3T3-L1 (Murata y col., 2000). El incremento de la secreción de leptina basal inducida por el EPA se relaciona estrechamente con la elevada utilización de glucosa e inversamente con el metabolismo anaeróbico de la glucosa a lactato (Perez-Matute y col., 2005). Sin embargo, otros estudios han demostrado efectos inhibitorios de los ácidos grasos polinosaturados n-3 sobre la expresión y secreción de leptina en diferentes líneas celulares (3T3-L1 y trofoblastos de la placenta humana) (Reseland y col., 2001; Cammisotto y col., 2003). Los presentes datos muestran un incremento de la cantidad de leptina total liberada tanto en la ausencia o presencia de insulina en los adipocitos aislados de ratas alimentadas con DRS+AHB que alcanzaron valores que se encuentran dentro del rango fisiológico. Esto fue acompañado con una disminuida lipólisis intracelular (el glicerol liberado fue similar al observado en el grupo DC). Hemos demostrado previamente (Rossi y col., 2010; Soria y col., 2002) una normalización de la captación de glucosa estimulada por insulina y de la acción antilipolítica de la hormona en el tejido adiposo de ratas alimentadas con DRS+AHB. Así, la adición de AHB dietario, el cual disminuye la lipólisis intracelular e incrementa la captación de glucosa en el adipocito, podría contribuir a normalizar la secreción de leptina en ratas alimentadas con DRS.

Parish y col. (1997) demostraron que el AHB dietario modifica la estructura de los fosfolípidos de la membrana plasmática de los adipocitos de ratas con un mayor contenido de ácidos grasos n-3 PUFAs, los cuales incrementarían la fluidez de la membrana. Aunque en este trabajo de tesis no analizamos la composición de ácidos grasos de la membrana plasmática del tejido adiposo, se ha demostrado previamente un incremento en los ácidos n-3 docosahexaenoico y eicosapentaenoico así como en la relación n-3/n-6 en el músculo esquelético y en la membrana microsomal del hígado de ratas alimentadas con DRS luego de la administración de AHB (Lombardo y col., 2007; Brenner y col., 2008). En consecuencia, estos cambios podrían estar involucrados en los mecanismos relacionados a los efectos de los AGNEs dietarios mejorando en el tejido adiposo la sensibilidad insulínica y la disminuida lipólisis.



La leptina sintetizada *de novo* puede ser almacenada, secretada o degradada intracelularmente antes de ser secretada (Roh y col., 2000). El estado nutricional o el estímulo hormonal podrían afectar cualquiera de estos procesos que regulan la liberación de leptina (Lee y Fried, 2006). Adipocitos hipertrofiados contienen una mayor cantidad de leptina comparados con los adipocitos más pequeños, tanto en ratas como en humanos (Lee y Fried, 2006; Lee y col., 2007). En concordancia con lo antedicho, los resultados obtenidos muestran, en las voluminosas células adiposas de las ratas alimentadas crónicamente con DRS, un significativo incremento de la concentración de leptina que se correlaciona positivamente con el incremento en la masa del tejido adiposo. Estos hallazgos demuestran que la producción de leptina es proporcional al tamaño de la célula adiposa y que la misma no se halla alterada en las ratas alimentadas con DRS; lo que sugiere que en este grupo experimental se reduce exclusivamente la secreción de leptina. En este sentido, la adición de AHB, que disminuye la hipertrofia celular sin cambios en el número de células adiposas redujo significativamente el contenido de leptina en el tejido adiposo de las ratas alimentadas con DRS. Es importante recalcar que todos los cambios mencionados anteriormente en los animales alimentados con DRS, en presencia o en ausencia de AHB, se observan sin modificación de la expresión del ARNm del gen *ob* en el tejido adiposo epididimal (Rossi y col., 2005).

Estudios que analizan el contenido de leptina en el tejido adiposo, particularmente en el modelo de DRS insulino resistente, son pocos. Peyron-Caso y col. (2002b) observaron que en animales alimentados durante 3 y 6 semanas con una dieta rica en sacarosa se induce un incremento paralelo en los niveles de leptina plasmática y en la adiposidad. Más aun cuando el tiempo de administración de la dieta se extiende de 3 a 6 semanas, se incrementó el contenido de leptina en el tejido adiposo cuando se lo comparó con ratas alimentadas con DC. Estas observaciones y los datos presentados sugieren que la disociación entre el incremento de peso y el contenido de leptina del tejido adiposo y la disminución plasmática de dicha adipocitoquina, se inicia luego de 6 semanas de administración de DRS y se expresa completamente luego de una administración prolongada de la misma.

Por otro lado, un comportamiento completamente distinto se observa en los niveles plasmáticos de leptina en las ratas alimentadas crónicamente con una dieta rica en grasa. En estos animales la obesidad, con una concomitante RI del tejido adiposo y elevada lipólisis, se correlaciona positivamente con la incrementada leptinemia. Sin embargo, Ainslie y col. (2000) demostraron una disminución en los niveles plasmáticos de leptina con un incremento



del peso del tejido adiposo en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa por un corto periodo de tiempo (4 semanas), sugiriendo que el efecto de la grasa dietaria en la leptinemia podría depender del tiempo de administración de la dieta y del tipo de grasa consumida, que puede tener efectos diferentes sobre la lipólisis y la captación de glucosa en el tejido adiposo. En consecuencia, es posible que diferentes factores y/o mecanismos puedan participar en la regulación de la liberación de leptina cuando la RI y la adiposidad son inducidas en ratas con una dieta rica en sacarosa o una dieta rica en grasa.

El efecto hipolipemiante del AHB que normalizó los niveles de AGNE y triglicéridos plasmáticos se vio también reflejado en la normalización de la adiponectina circulante y de la VIG. El incremento de adiponectina se correlacionó positivamente con la sensibilidad insulínica y negativamente con los niveles de ácidos grasos circulantes. Estos resultados están en concordancia con las observaciones de los estudios de Delporte y col. (2002).

Desde hace algunos años se ha constatado que un primer nexo molecular entre obesidad e inflamación se relaciona con los niveles de TNF- $\alpha$ . Esta adipocitoquina se sobreexpresa en el tejido adiposo de todos los modelos de obesidad en roedores y en los humanos obesos (Wellen y Hotamisligil, 2005; Hotamisligil y col., 1995).

Nuestros datos demuestran un incremento significativo del contenido de TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo epididimal de las ratas alimentadas crónicamente con DRS. Coincidiendo con nuestros hallazgos Liang y col. (2008) hallaron un significativo incremento del contenido de TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo epididimal de ratas Wistar alimentadas con una dieta rica en grasa (33 % y sacarosa 20% de energía respectivamente) durante 20 semanas. Además, Borst y Conover (2005) demostraron en el tejido adiposo retroperitoneal de ratas Wistar alimentadas con una dieta rica en grasa (50 % calorías) un significativo incremento de TNF- $\alpha$ . Nara y col. (1999) observaron un significativo incremento de los niveles de TNF- $\alpha$  en la grasa mesentérica de ratas Wistar alimentadas durante 3 meses con dieta rica en sacarosa comparada con sus controles etarios. Mientras que un estudio de Aguilera y col. (2004) demostró un aumento de los niveles de TNF- $\alpha$  plasmáticos en ratas alimentadas con DRS (30% en agua de bebida) por 27 semanas.

El TNF- $\alpha$  jugaría un rol clave en el metabolismo lipídico del adipocito. El tratamiento con TNF- $\alpha$  decrece la expresión y actividad de la LPL e incrementa la lipólisis, reduciendo la



acumulación de lípidos en el adipocito (Laurencikiene y col., 2007; Landström y col., 2000). Además, la activación de la PKA por el TNF- $\alpha$  conduce a un incremento de la fosforilación de las perilipinas incrementando la lipólisis (Zhang y col., 2002).

Elevados niveles de AGNEs plasmáticos se relacionan estrechamente con la RI. Un incremento de la expresión, masa proteica y niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  es un factor importante de la RI en el adipocito por modificación de la activación del receptor de insulina, la fosforilación del IRS-1 y el decrecimiento de la síntesis y translocación del GLUT4 (Ruan y Lodish, 2003). También se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  disminuye la expresión de los transportadores de ácidos grasos libres (tales como FATP y FAT) en el tejido adiposo (Memon y col., 1998). Estas acciones del TNF- $\alpha$  podrían contribuir a la dislipemia e insensibilidad insulínica observada en los animales alimentados con DRS.

Numerosos estudios se han focalizado en el efecto de los ácidos grasos polinosaturados n-3 sobre la producción de citoquinas inflamatorias (Chapkin y col., 2009). En los animales alimentados con DRS la administración de n-3 PUFAs fue capaz de normalizar los niveles incrementados de TNF- $\alpha$  que alcanzaron valores similares al grupo DC. Al respecto Muurling y col. (2003) encontraron una disminución en la expresión de la masa proteica del TNF- $\alpha$  en tejido adiposo blanco de ratones E3L alimentados con dieta rica en grasa con 3 % de aceite de pescado respecto al grupo que no recibió los n-3 PUFAs. Perez-Matute y col. (2007) constataron en ratas Wistar alimentadas durante 5 semanas con una dieta rica en grasa (dieta de cafetería) un incremento significativo de la expresión génica de TNF- $\alpha$ ; mientras que cuando los animales recibieron simultáneamente EPA etil ester (1g/Kg) por vía oral durante el mismo periodo de tiempo fue posible prevenir el incremento de esta citoquina inflamatoria. Sin embargo, Aguilera y col. (2004) observaron que la administración de aceite de pescado durante las últimas 6 semanas de dieta no modifica los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  en ratas alimentadas crónicamente (27 semanas) con DRS.

Estudios con cultivos de células muestran que el EPA y DHA pueden inhibir la producción de TNF- $\alpha$  por los monocitos. El aceite de pescado en la dieta disminuye la producción de TNF- $\alpha$  *ex vivo* por los macrófagos de roedores. También se ha observado en personas sanas que la administración de 2 g de EPA+DHA por día disminuyó la producción de TNF- $\alpha$  por las células mononucleares (Calder, 2006). Más aún, Winkler y col. (2003) han demostrado que los niveles de ARNm y masa proteica de TNF- $\alpha$  se correlacionan



positivamente con adiposidad y volumen celular del tejido adiposo. En esta línea, nuestros resultados señalan que la administración de AHB disminuyó el peso del tejido epididimal y el volumen celular en los animales alimentados con DRS, correlacionándose positivamente con la disminución del contenido de TNF- $\alpha$  en dicho tejido.

Algunas de las alteraciones metabólicas relacionadas con la hipertrofia y disfunción de las células grasas se asocian con la expresión del receptor activador de la proliferación peroxisomal  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ). En el tejido adiposo el PPAR- $\gamma$  además de regular la adipogénesis regula positivamente la expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos entre ellos aP2, FABP4, acil-CoA sintetasa, proteína transportadora de ácidos grasos, LPL. Más aun, el PPAR- $\gamma$  reprime la expresión de genes implicados en la lipólisis y la liberación de ácidos grasos tales como el receptor  $\beta$ 3-adrenérgico y de adipocitoquinas como leptina y TNF- $\alpha$ . El PPAR- $\gamma$  también regula efectivamente la expresión de genes implicados en la respuesta a la insulina, entre otras funciones (Sandoval y col., 2009). Brun y col. (1997) demostraron en adipocitos de ratas y humanos obesos una significativa disminución del contenido del ARNm del PPAR- $\gamma$ . Más aun en los animales alimentados crónicamente con DRS la reducción de los niveles plasmáticos de leptina y su normalización bajo la administración de AHB podrían estar relacionados con cambios en la expresión génica y la masa proteica del PPAR- $\gamma$ . Esto nos condujo a analizar si cambios en la masa proteica del PPAR- $\gamma$  podrían contribuir a la disfunción del tejido adiposo en los animales alimentados con DRS. En relación a lo expuesto nuestros resultados (Parte II B) muestran una significativa reducción de la expresión de la masa proteica del PPAR- $\gamma$  en el tejido adiposo de los animales alimentados con DRS. Esto podría contribuir a la alterada capacidad de dichos adipocitos para esterificar ácidos grasos a triglicéridos lo que conduce a un incremento de la liberación de ácidos grasos a la circulación como pudo ser observado en los niveles circulantes de AGNEs y en la mayor lipólisis basal *in vitro*.

Los ligandos del PPAR- $\gamma$  (agonistas) promueven la restauración a niveles normales de sustancias derivadas del tejido adiposo, incluyendo AGNEs, TNF- $\alpha$ , leptina, adiponectina y PAI-1 (Sharma y Staels, 2007). El ácido eicosapentaenoico 22:5, un ácido graso n-3 presente en el AHB dietario es uno de los ligandos naturales del PPAR- $\gamma$ . La mayor expresión de la masa proteica del PPAR- $\gamma$  observada en el grupo DRS + AHB podría ser un posible mecanismo responsable de la marcada reducción de: la masa del tejido adiposo, la hipertrofia



de las células grasas y la alterada distribución del tamaño celular en este grupo dietario, conduciendo a adipocitos más pequeños y más sensibles a la acción insulínica. Además en este contexto Iwata y col. (2001) y Smith y col. (2001) demostraron que el PPAR- $\gamma$  regula los substratos receptores de insulina (IRS-1, IRS-2), los cuales son necesarios para activar la captación de glucosa estimulada por la insulina y mediada por el transportador de glucosa GLUT4. Nuestros datos demuestran que la captación de glucosa bajo el estímulo de la insulina se normalizó por la administración de n-3 PUFAs dietarios. Además la incorporación de los ácidos n-3 dietarios podrían también estar involucrados en el incremento de adiponectina plasmática a través de la activación selectiva del PPAR- $\gamma$  en el tejido adiposo. Gustafson y col. (2003) observaron que el PPAR- $\gamma$  regula la síntesis y secreción de la adiponectina.

En la adiposidad el procesamiento del exceso de ácidos grasos por la mitocondria causa desacoplamiento mitocondrial (Ferranti y Mozaffarian, 2008). Se ha observado que el incremento de los ácidos grasos circulantes resultantes de un ayuno, diabetes o una dieta rica en grasa lleva a una estimulación en la expresión de la proteína desacoplante 2 (UCP2) en tejido adiposo (Thompson y Kim, 2004). También se ha constatado un aumento de la expresión génica de la UCP2 en tejido adiposo de ratones genéticamente obesos. Así por ejemplo en el tejido adiposo blanco de ratones *ob/ob* el ARNm de la UCP2 se encuentra incrementado 3,9 veces y en ratones *db/db* 3,5 veces comparado con sus respectivos controles. La mayor expresión génica de la UCP2 en el tejido adiposo de ratones *ob/ob* podría ser una respuesta adaptativa a la elevada acumulación de lípidos para disponer el exceso de energía desacoplando la respiración mitocondrial de la fosforilación oxidativa, resultando en una disminuida producción de energía (Memon y col., 2000).

Nuestros resultados (Parte II B) muestran que la expresión de la masa proteica de la UCP2 se incrementó significativamente en el tejido adiposo epididimal hipertrofiado de los animales dislipémicos que recibieron crónicamente DRS respecto del grupo que recibió DC. Además, Chicco y col. (2005) demostraron en ratas Wistar alimentadas con DRS por un periodo corto de tiempo (3 semanas) un significativo incremento en la expresión génica de la UCP2 en el tejido adiposo epididimal que se correlaciona con los niveles elevados de AGNE plasmáticos. Es interesante destacar que en estos animales -a diferencia de los alimentados



crónicamente (8 meses) con DRS- no se observó adiposidad visceral. Wang y col. (2007) observaron que el ARNm de la UCP2 se incrementó significativamente en el tejido adiposo de ratas Wistar alimentadas durante 4 semanas con dieta control a la que se le adicionó 20% de sacarosa y 10% de manteca de cerdo cuando se la comparó con el grupo que recibió dieta control.

La ingesta de n-3 PUFAs previene la acumulación selectiva de grasa (Hill y col., 1993; Peyron-Caso y col., 2002b; Rossi y col., 2005), pero poco se conoce del efecto de los n-3 PUFAs sobre la regulación de las UCPs, en especial la UCP2 en ratas alimentadas crónicamente con DRS. En el presente trabajo de tesis demostramos que la administración de aceite de pescado a los animales alimentados con DRS, disminuyó los niveles de la expresión de la masa proteica de la UCP2, alcanzando valores significativamente inferiores a los observados en los animales controles. Esto se correlacionó con una significativa disminución de la adiposidad visceral y normalización de la dislipemia. En esta dirección Chicco y col. (2005) observaron que la utilización de aceite de pescado como fuente de grasa dietaria en la DRS (administrada por 3 semanas) previno el incremento de la expresión génica de la UCP2.

Flachs y col. (2005) hallaron en el tejido adiposo epididimal de ratones C57BL/6J de 4 meses de edad alimentados por 5 semanas con una dieta rica en grasa [donde el 15% de los lípidos fueron reemplazados con un concentrado de n-3 PUFAs (6% de EPA y 51% de DHA)] una disminuida expresión génica de la UCP2 cuando se la comparó con la de aquellos alimentados con una dieta rica en grasa sin adición de n-3 PUFAs. Por otro lado, Hun y col. (1999) reportaron que el reemplazo parcial (30%) de aceite de perilla por aceite de pescado durante 3 meses incrementó la expresión del ARNm de la UCP2 en el tejido adiposo epididimal de ratones KKAY, mientras que el reemplazo parcial (30%) de aceite de soja o manteca de cerdo por aceite de pescado durante el mismo periodo de tiempo no indujo cambios en la expresión del ARNm de la UCP2 en el tejido adiposo de dichos ratones.

Una clara conexión entre los niveles de ácidos grasos y la expresión de la UCP2 en tejido adiposo epididimal también ha sido demostrada en preadipocitos 3T3-L1 cultivados *in vitro* con ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados (Reilly y Thompson, 2000). La acción de los ácidos grasos fue dependiente de la dosis y del tiempo de incubación. Todos los ácidos grasos analizados afectaron la expresión de la UCP2 de manera diferente. Los n-6 y n-3 polinosaturados y los n-9 monoinsaturados incrementaron de manera similar la expresión



de la UCP2, mientras que el ácido graso saturado (18:0) fue mucho menos efectivo. Esto sugiere que los ácidos grasos insaturados utilizan una vía común, probablemente debido a un incremento en la transcripción antes que a un efecto directo de la naturaleza de los ácidos grasos (Reilly y Thompson, 2000).

Por otro lado, Kelly y col. (1998) observaron en adipocitos de ratones *db/db* tratados durante 2 semanas con un agonista del PPAR- $\gamma$  (tiazolinediona) un incremento de la expresión del PPAR- $\gamma$  sin cambios en la expresión génica de la UCP2. Los ácidos grasos n-3 PUFAs o sus metabolitos son agonistas del PPAR- $\gamma$  y nuestros resultados demostraron un incremento en la expresión de la masa proteica de dicho factor de transcripción en los animales alimentados con DRS+AHB y un decrecimiento de la masa proteica de la UCP2. Nosotros no cuantificamos la expresión génica de la UCP2 pero es bien aceptado en general que ambos parámetros pueden o no mostrar el mismo comportamiento

Masaki y col. (1999) demostraron que una dosis intraperitoneal de TNF- $\alpha$  incrementa la expresión del ARNm de la UCP2 en el tejido adiposo epididimal de ratas Wistar, alcanzando valores máximos en función del tiempo de administración. Otros autores observaron también una correlación entre niveles del TNF- $\alpha$  y de la expresión génica de la UCP2 en diferentes tejidos tales como hígado y músculo esquelético (Busquets y col., 1998; Cortez-Pinto y col., 1998; Lee y col., 1999). Nuestros resultados *ex vivo* demuestran una correlación positiva entre el contenido de TNF- $\alpha$  y la expresión de la masa proteica de la UCP2 en tejido adiposo epididimal en los animales tratados con DRS y DRS+AHB. De lo expuesto, el TNF- $\alpha$  podría estar involucrado en la regulación de la masa proteica de la UCP2, al menos en el tejido adiposo en este modelo experimental.

Los resultados precedentes nos demuestran que la adiposidad visceral presente en las ratas alimentadas con DRS indujo un desacoplamiento mitocondrial (incremento de la masa proteica de la UCP2) y una desregulación de adipocitoquinas que fueron mejoradas luego de la administración de AHB. La adiposidad se asocia con estrés oxidativo pudiendo producir un desbalance entre los niveles de las especies reactivas del oxígeno (ROS). Los ácidos grasos también están implicados en la activación del estrés oxidativo, no solo por desacoplar la fosforilación oxidativa e incrementar la generación de ROS sino también por deteriorar las



defensas antioxidantes (Subauste y Burant, 2007). Dentro de este contexto nos propusimos analizar algunas enzimas antioxidantes y oxidantes (Parte II C) (productoras de ROS) involucradas en el estrés oxidativo.

Al respecto, en el tejido adiposo epididimal de ratas Wistar alimentadas crónicamente (8 meses) con DRS, en ausencia o presencia de AHB, los hallazgos más importantes de esta tesis fueron:

1. Un incremento significativo de la actividad enzimática xantino oxidoreductasa (XOR) (xantino oxidasa y xantino deshidrogenasa) y xantino oxidasa. La actividad de estas enzimas mejoró luego de la administración de AHB dietario pero sin alcanzar los valores de los animales controles alimentados con DC.

2. El incremento en el contenido de TBARS no se modificó en presencia de AHB.

3. Una disminución significativa de las actividades de las enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa) que se normalizaron o mejoraron en presencia de AHB dietario.

4. Un incremento del contenido de glutatión total que mejoró con la adición de AHB dietario.

La enzima xantino oxidoreductasa se encuentra estrechamente vinculada con la generación de ROS. Es una enzima específica que produce especies reactivas del oxígeno y subsecuentemente estrés oxidativo. Hemos observado un incremento en la actividad xantino oxidoreductasa (XOR) y xantino oxidasa (XO) en el tejido adiposo epididimal de los animales alimentados con DRS. Cheung y col. (2007) demostraron que la expresión génica y la actividad enzimática de la XO y su producto metabólico, el ácido úrico, se encuentran significativamente elevados en el tejido adiposo de ratones *ob/ob* de 2 meses de edad respecto a sus controles etarios. En estos animales la expresión de la XO es más elevada en tejido adiposo cuando se la compara con otros tejidos (hígado, músculo, páncreas e hipotálamo). Desco y col. (2002) observaron un incremento en la actividad de la xantino oxidasa y xantino deshidrogenasa en el hígado de ratas Wistar adultas con diabetes experimental (inducida por administración de una única dosis de streptozotocina) comparada con sus respectivos controles. De manera similar la actividad XO plasmática de los animales diabéticos incrementó un 30% sobre el nivel de los animales controles.



Nuestros resultados mostraron que la sustitución parcial de aceite de maíz por AHB durante 2 meses de experimentación disminuyó significativamente las actividades XOR y XO en los animales alimentados con DRS. Al presente no conocemos el efecto del AHB sobre la actividad XOR o XO en tejido adiposo epididimal de otros modelos experimentales. Sin embargo, en hígado Kim y col. (2005) constataron que el incremento en la actividad de la XO observado con el cambio de edad (periodo de 4 a 9 meses) en los ratones controles en los cuales el aceite de maíz se utilizó como fuente de grasa dietaria, fue suprimido cuando se administró aceite de pescado (5%); y Erdogan y col. (2004) no hallaron diferencias en la actividad de la XO plasmática en ratas Wistar alimentadas con 0,4 g/Kg de aceite de pescado durante 1 mes comparadas con sus respectivos controles.

Los productos aldehídicos secundarios de la peroxidación lipídica son marcadores aceptados de estrés oxidativo. En la presente tesis observamos un incremento significativo del contenido de TBARS en el tejido adiposo epididimal de los animales alimentados crónicamente con DRS respecto a los que recibieron DC. Un incremento similar fue observado a nivel plasmático (datos no mostrados). Los resultados de la peroxidación lipídica en tejido adiposo son contradictorios. Al respecto, Robolledo y col. (2008) hallaron que la administración de una dieta rica en fructosa (10% en el agua de bebida) durante 3 semanas a ratas Wistar induce un incremento en el contenido de TBARS en el tejido adiposo. Sin embargo, Sohet y col. (2009) reportaron que ratones C57BL6/J alimentados durante 60 días con una dieta rica en grasa más 21% de fructosa en el agua de bebida no produce cambios en el contenido de TBARS en el tejido adiposo epididimal.

En otros tejidos así como en orina y plasma también se ha visto un incremento en la peroxidación lipídica en animales alimentados con dietas ricas en azúcares, por ejemplo, Busserolles y col. (2002) utilizando ratas Wistar hallaron un aumento en el contenido de TBARS en plasma, orina, corazón, timo y páncreas luego de la administración de una DRS por 2 semanas cuando se los comparó con animales alimentados con dieta control. Además, Thirunavukkarasu y col. (2003) demostraron un incremento en los TBARS en hígado y riñón de ratas Wistar adultas alimentadas durante 20 días con una dieta rica en fructosa (61 %) cuando se las comparó con los animales que recibieron DC.



Algunos estudios han evaluado el contenido de TBARS en diferentes tejidos. Al respecto, Kubo y col. (1998), Saito y Kubo (2003) y Sekine y col. (2003) en hígado y riñón de ratas observaron un incremento de los mismos luego de la administración de aceite de pescado o de DHA, mientras que en testículo no encontraron un incremento en los niveles de peroxidación lipídica. Nuestros hallazgos no muestran cambios en los niveles de TBARS en tejido adiposo de los animales alimentados con DRS+AHB cuando se las compara con el grupo que recibió DRS.

Dentro de la batería enzimática y no enzimática que protegen al tejido adiposo de una excesiva producción de ROS, analizamos en primer lugar la actividad enzimática de la catalasa. Una significativa disminución de la actividad catalasa en el tejido adiposo epididimal hipertrofiado de los animales alimentados crónicamente con DRS, que se normalizó bajo la administración de AHB fue observado en el presente trabajo. Furukawa y col. (2004) observaron en ratones obesos KKAY una reducida expresión génica de la catalasa en el tejido adiposo blanco sin cambios en hígado o músculo esquelético, lo que conduciría a una elevada producción de ROS en el tejido adiposo de estos ratones. La administración de una dieta rica en fructosa por un periodo de 20 días disminuyó la actividad de la catalasa en hígado y riñón de ratas Wistar comparadas con sus controles etarios (Thirunavukkarasu y col., 2003). Además, en músculo, Adéchian y col. (2009) demostraron que la administración de una dieta rica en grasa y sacarosa por 5 semanas redujo la actividad catalasa, y Valls y col. (2003) encontraron una disminuida actividad catalasa en el tejido adiposo de ratas Wistar alimentadas con una dieta hiperlipídica comparada con los animales que recibieron DC. Otros autores han observado además una disminución de la expresión génica y actividad de dicha enzima en diferentes tejidos de ratas o ratones alimentados con dietas ricas en grasa (Amin y col., 2009; Tomás-Moyá y col., 2008; Colbert-Coate y Huggins, 2010).

Okuno y col. (2008) demostraron que la expresión del ARNm de la catalasa disminuye en paralelo con la expresión génica del PPAR- $\gamma$  frente a la administración de cantidades crecientes del TNF- $\alpha$  en cultivo de células 3T3-L1. Por otro lado, cuando las células 3T3-L1 son cultivadas en presencia de un agonista del PPAR- $\gamma$  (pioglitazona) se observa un incremento en la expresión génica y actividad de la catalasa. Estos datos sugieren que el PPAR- $\gamma$  jugaría un rol crucial en la regulación transcripcional de la catalasa, ya que se ha



identificado una región del gen de la catalasa que contiene elementos de respuesta al PPAR- $\gamma$ . De lo expuesto, la administración de una DRS, la cual disminuye la masa proteica del PPAR- $\gamma$ , e incrementa los niveles intracelulares del TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo, podría estar involucrada en la disminución de la actividad de la catalasa. El AHB es un agonista natural del PPAR- $\gamma$  y nuestros resultados demostraron un incremento de la expresión de la masa proteica del PPAR- $\gamma$  acompañada de una normalización de la actividad catalasa y del TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo de los animales que recibieron DRS+AHB. Al respecto, otros autores han señalado un incremento de la actividad de esta enzima en hígado y corazón de ratas donde se administró aceite de pescado dietario (De Craemer y col., 1994; Chapman y col., 2000; Yamazaki y col., 1987; Neat y col., 1981).

La actividad de la glutation peroxidasa (GPx) es importante para predecir el estado redox de un tejido, una disminución en la actividad de la misma podría relacionarse con el bajo poder reductor NADPH/NADP<sup>+</sup> inducido por un incremento en la susceptibilidad al estrés oxidativo (Mercier y col., 2008).

La disminución de la actividad de la GPx observada en el tejido adiposo epididimal de los animales crónicamente alimentados con DRS, está en concordancia con los resultados encontrados por distintos autores en diferentes modelos experimentales. Al respecto, Rebolledo y col. (2008) encontraron una disminuida actividad GPx en el tejido adiposo de ratas Wistar alimentadas con una dieta rica en fructosa (10% en el agua de bebida) durante 3 semanas; y Girard y col. (2005) encontraron una disminución, aunque sin llegar a ser significativa, en la actividad de la GPx en el tejido adiposo de ratas Wistar alimentadas con una dieta enriquecida en fructosa y ácidos grasos saturados al compararla con el grupo que recibió dieta control. Furukawa y col. (2004) observaron una disminución en la actividad de la GPx en el tejido adiposo blanco de ratones KKAY a las 7 y 13 semanas de vida comparados con ratones de la cepa C57BL/6 de igual edad. Sin embargo, una disminución en la expresión génica de la GPx solo fue observada a las 7 semanas. Un decrecimiento en la actividad de la GPx fue también observado en tejido adiposo epididimal de ratas Zucker obesas y ratones *ob/ob* (Galinier y col., 2006b; Kobayashi y col., 2009). Además, Kobayashi y col. (2009) demostraron una disminución en la expresión del ARNm de la GPx en adipocitos 3T3-L1 cultivados en presencia de TNF- $\alpha$ . El incremento en el contenido de TNF- $\alpha$  observado en el



tejido adiposo de ratas alimentadas con DRS podría estar involucrado en la reducción de la actividad de esta enzima.

Otra enzima clave en el sistema antioxidante que protege a las células de los radicales libres es la glutatión reductasa (GR). Como mencionamos anteriormente dicha enzima cataliza la reducción de GSSG a GSH por un mecanismo NADPH dependiente. Nuestros resultados demostraron que en el tejido adiposo de ratas Wistar alimentadas crónicamente con DRS la actividad GR disminuyó significativamente respecto del grupo que recibió DC. Otros estudios utilizando ratas Wistar alimentadas durante 3 semanas con dietas ricas en fructosa (10% en agua de bebida) o 2 meses con dietas compuestas por 18% fructosa y 11% de ácidos grasos saturados observaron un incremento en la actividad de la GR en tejido graso abdominal (Rebolledo y col., 2008; Girard y col., 2005). Por otro lado, Thirunavukkarasu y col. (2003) alimentando ratas Wistar durante 20 días con una dieta rica en fructosa (61% p/p) demostraron un significativo decrecimiento de la actividad de la GR en tejido hepático y riñón cuando se las compara con los animales alimentados con dieta control. Los resultados mencionados sugieren que el tiempo, tipo de azúcares simples en la dieta y forma de administración de la misma participarían en los cambios observados en los tejidos, incluyendo el adiposo, sobre la actividad GR.

La administración de AHB durante los últimos 2 meses de experimentación en las ratas alimentadas con DRS normalizó la actividad de la GPx e incrementó la actividad de la GR aunque en esta última sin llegar a alcanzar los niveles observados en los animales con DC. Al respecto, Chow y col. (1973) observaron una mayor actividad GPx y GR en el tejido adiposo perirenal de ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 7 meses con una dieta cuya fuente grasa fue aceite de hígado de bacalao (15,7%) comparada con las ratas alimentadas isocalóricamente con aceite de maíz (15,7%) por el mismo periodo de tiempo.

El glutatión es el tiol no proteico predominante en las células. Durante el estrés oxidativo y deficiencia de GR, el GSSG intracelular se acumula y la pérdida de balance redox de tioles puede tener consecuencias deletéreas en la regulación metabólica, la integridad celular y la homeostasis de los tejidos (Tandogan y Ulusu, 2006).



Los resultados obtenidos en el tejido adiposo epididimal hipertrofiado de ratas alimentadas crónicamente con DRS demuestran un incremento del contenido de glutatión total (reducido y oxidado) cuando se lo compara con lo observado en los animales alimentados con DC. En un trabajo reciente Galinier y col. (2006a) demostraron en el tejido adiposo inguinal y epididimal de ratas Zucker obesas un incremento del contenido total de glutatión y una disminución significativa del estado redox del glutatión (calculado como el cociente entre la concentración de glutatión oxidado y glutatión total) comparado con los controles delgados. Un estado redox del glutatión similar también fue constatado en la presente tesis en las ratas alimentadas crónicamente con DRS. Por otro lado, Rebolledo y col. (2008) observaron una disminución del contenido de glutatión total en el tejido adiposo blanco de ratas Wistar que recibieron durante 3 semanas una dieta comercial estándar adicionada de 10% de fructosa en el agua de bebida.

La sustitución parcial de aceite de maíz por AHB en el grupo alimentado con DRS redujo el contenido de glutatión total incrementando el estado redox del glutatión aunque sin alcanzar los niveles observados en los animales controles alimentados con DC. Una disminución en los niveles plasmáticos de glutatión reducido fue observado en ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 10 semanas con aceite de pescado (menhaden) comparadas con las que recibieron aceite de soja dietario (Meté y col., 1999).

De los resultados expuestos en esta última parte de la tesis constatamos en el tejido adiposo de los animales alimentados crónicamente con DRS un importante incremento del estrés oxidativo. Además nuestros datos sugieren que la administración de AHB, el cual induce un incremento de las actividades de las enzimas antioxidantes y una disminución de la actividad xantino oxidasa, contribuiría a proteger al tejido adiposo de la generación de ROS.

# **CONCLUSIONES**



## **CONCLUSIONES:**

El estilo de vida moderno (sedentarismo) y la composición de la dieta (excesivo consumo de bebidas conteniendo sacarosa y alimentos ricos en carbohidratos simples y grasas saturadas), junto a los factores genéticos, contribuyen a una mayor incidencia del Síndrome metabólico, en el cual la dislipemia, insulino resistencia, adiposidad visceral entre otras juegan un papel fundamental.

En este trabajo de tesis utilizamos un modelo nutricional de dislipemia, adiposidad visceral y resistencia insulínica en presencia de alterados niveles de adipocitoquinas (leptina y adiponectina) inducido por la administración crónica de una dieta rica en sacarosa. Los resultados obtenidos sugieren: la mayor disponibilidad de AGNEs (plasmáticos y tisulares) y la insensibilidad insulínica conducen a una menor secreción de leptina y acumulo de esta adipocitoquina en el tejido adiposo. La elevada lipólisis observada en este tejido entre otros factores también estaría involucrada en el incremento del contenido de TNF- $\alpha$  y menor expresión de la masa proteica del PPAR- $\gamma$ . Además, el procesamiento del exceso de ácidos grasos en el tejido adiposo podría causar desacoplamiento mitocondrial, debido al incremento de la expresión de la masa proteica de la UCP2, incrementar la generación de especies reactivas del oxígeno a través de un aumento en la actividad oxidante y disminución de las defensas antioxidantes, conduciendo a estrés oxidativo. Sin perjuicio de otros factores que podrían también estar involucrados, todos los hallazgos aquí descriptos contribuirían a la desregulación funcional del tejido adiposo. Los resultados obtenidos son consistentes con lo antedicho ya que la administración de AHB dietario que normaliza la dislipemia e insensibilidad insulínica logra mejorar significativamente la disfunción del tejido adiposo.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



---

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

- Abilés, J; Moreno-Torres, R; Moratalla, G; Castaño, J; Pérez Abúd, R; Mudarra, A; Machado, MJ; Planells, E y Pérez de la Cruz, A. (2008) *Efectos de la suplementación con glutamina sobre el sistema antioxidante y la peroxidación lipídica en pacientes críticos con nutrición parenteral*. Nutr Hosp, 23: 332-339.
- Adéchan, S; Giardina, S; Rémond, D; Papet, I; Buonocore, D; Gaudichon, C; Dardevet, D; Marzatico, F y Mosoni, L. (2009) *Excessive Energy Intake Does Not Modify Fed-state Tissue Protein Synthesis Rates in Adult Rats*. Obesity, 17: 1348-1355.
- Aguilera, AA; Diaz, GH; Barcelata, ML; Guerrero, OA y Ros, RM. (2004) *Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome*. J Nutr Biochem, 15: 350-357.
- Ahima, RS. (2008) *Revisiting leptin's role in obesity and weight loss*. J Clin Invest, 118: 2380-2383.
- Ainslie, DA; Proietto, J; Fam, BC y Thorburn, AW. (2000) *Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats*. Am J Clin Nutr, 71: 438-442.
- Alberti, KG; Zimmet, P y Shaw, J. (2005) *The metabolic syndrome - a new worldwide definition*. Lancet, 366: 1059-1062.
- Alessi, MC; Poggi, M y Juhan-Vague, I. (2007) *Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance*. Curr Opin Lipidol, 18: 240-245.
- Arner, P. (2003) *The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones*. Tr Endocrinol Metab, 14: 137-145.
- Badman, MK y Flier, JS. (2007) *The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism*. Gastroenterology, 132: 2103-2115.



- 
- Barroso, I; Gurnell, M; Crowley, VE; Agostini, M; Schwabe, JW; Soos, MA; Maslen, GL; Williams, TD; Lewis, H; Schafer, AJ; Chatterjee, VK y O’Rahilly, S. (1999) *Dominant negative mutations in human PPAR-gamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension*. Nature, 402: 880-883.
  
  - Bastard, JP; Jardel, C; Bruckert, E; Blondy, P; Capeau, J; Laville, M; Vidal, H y Hainque, B. (2000) *Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss*. J Clin Endocrinol Metab, 85: 3338-3342.
  
  - Becker, DJ; Ongemba, LN; Brichard, V; Henquin, JC y Brichard, SM. (1995) *Diet- and diabetes-induced changes of ob gene expression in rat adipose tissue*. FEBS Lett, 371: 324-328.
  
  - Benatti, P; Peluso G; Nicolai, R y Calvani, M. (2004) *Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties*. J Am Coll Nutr, 23: 281-302.
  
  - Benhizia, F; Hainault, I; Serougne, C; Lagrange, D; Hajduch, E; Guichard, C; Malewiak, M; Quignard-Boulangé, A; Lavau, M y Griglio, S. (1994) *Effects of a fish oil-lard diet on rat plasma lipoproteins, liver FAS, and lipolytic enzymes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 267: E975-E982.
  
  - Berghofer, A; Pischon, T; Reinhold, T; Apovian, CM; Sharma, AM y Willich, SN. (2008) *Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review*. BMC Public Health, 8: 200.
  
  - Bergmeyer, HU. (1974) *Methods for determination of metabolites. Methods of Enzymatic Analysis (2nd ed.)*, (editado por Bergmeyer, HU). Academic Press. New York. 1100-2110.
  
  - Blakely, SR; Hallfrish, J y Reiser S. (1982) *Long-term effects of moderate fructose feeding on lipogenic parameters in Wistar rats*. Nutr Rep Int, 25: 675-685.



- 
- Borst, SE y Conover, CF. (2005) *High-fat diet induces increased tissue expression of TNF-alpha*. Life Sci, 77: 2156-2165.
  
  - Boss, O; Hagen, T y Lowell, BB. (2000) *Uncoupling proteins 2 and 3. Potential regulators of mitochondrial energy metabolism*. Diabetes, 49: 143-156.
  
  - Brenner, RR; Montanaro, M; Bernasconi, M; Pellon-Maiso, M; Finarelli, G; Hein, G; Chicco, A y Lombardo, YB. (2008) *Effect of fish oil on the unsaturated fatty acid metabolism in dyslipemic sucrose fed rats*. 49<sup>th</sup> International Conference on the Bioscience of Lipids. Maastricht, Netherlands. Chem Phys Lipids, 279: E893-E899.
  
  - Brichard, SM; Delporte, ML y Lambert, M. (2003) *Adipocytokines in anorexia nervosa: a review focusing on leptin and adiponectin*. Horm Metab Res, 35: 337-342.
  
  - Bruun, JM; Lihn, AS; Verdich, C; Pedersen, SB; Toubro, S; Astrup, A y Richelsen, B. (2003) *Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 285: E527-E533.
  
  - Buettner, C; Muse, ED; Cheng, A; Chen, L; Scherer, T; Poci, A; Su, K; Cheng, B; Li, X; Harvey-White, J; Schwartz, GJ; Kunos, G; Rossetti, L y Buettner, C. (2008) *Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms*. Nat Med, 14: 667-675.
  
  - Busquets, S; Sanchís, D; Alvarez, B; Ricquier, D; Lopez-Soriano, F y Argilès, J. (1998) *In the rat, tumor necrosis factor K administration results in an increase in both UCP2 and UCP3 mRNAs in skeletal muscle: a possible mechanism for cytokine-induced thermogenesis?*. FEBS Lett, 440: 348-350.
  
  - Busserolles, J; Rock, E; Gueux, E; Mazur, A; Grolier, P y Rayssiguier, Y. (2002) *Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats*. Br J Nutr, 87: 337-342.



- 
- Calder, P. (2006) *N-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases*. Am J Clin Nutr, 83: 1505S-1519S.
  
  - Cammisotto, PG y Bukowiecki, LJ. (2002) *Mechanisms of leptin secretion from white adipocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 283: C244-C250.
  
  - Cammisotto, PG; Gelinas, Y; Deshaces, Y y Bukowiecki, LJ. (2003) *Regulation of leptin secretion from white adipocyte by free fatty acids*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 285: E521-E526.
  
  - Cammisotto, PG; Gelinas, Y; Deshais, Y y Bukowiecki, LJ. (2005) *Regulation of leptin secretion from white adipocytes by insulin. Glycolytic substrates and amino acids*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 289: E166-E171.
  
  - Capeau, J. (2007) *The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: to follow*. J Hepatol, 47: 736-738.
  
  - Carpentier, Y; Portois, L y Malaisse, W. (2006) *n-3 Fatty acids and the metabolic syndrome*. Am J Clin Nutr, 83: 1499S-1504S.
  
  - Cawthorn, WP y Sethi, JK. (2008) *TNF-alpha and adipocyte biology*. FEBS Lett, 582: 117-131.
  
  - Clarke, SD. (2001) *Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Transcription: A Molecular Mechanism to Improve the Metabolic Syndrome*. J Nutr, 131: 1129-1132.
  
  - Cohen, AM; Briller, S y Shafir, E. (1972) *Effects of long term sucrose feeding on the activity of some enzymes regulating glycolysis, lipogenesis and gluconeogenesis in rat liver and adipose tissue*. Biochim Biophys Acta, 279:129-138.



- 
- Colbert-Coate, K y Huggins, K. (2010) *Consumption of a high glycemic index diet increases abdominal adiposity but does not influence adipose tissue pro-oxidant and antioxidant gene expression in C57BL/6 mice*. Nutr Res, 30: 141-150.
  
  - Combs, TP; Wagner, JA; Berger, J; Doebber, T; Wang, WJ; Zhang, BB; Tanen, M; Berg, AH; O'Rahilly, S; Savage, DB; Chatterjee, K; Weiss, S; Larson, PJ; Gottesdiener, KM; Gertz, BJ; Charron, MJ; Scherer, PE y Moller DE. (2002) *Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization*. Endocrinol, 143: 998-1007.
  
  - Connor, WE. (2000) *Importance of n-3 fatty acids in health and disease*. Am J Clin Nutr, 71: 171S-175S.
  
  - Cortez-Pinto, H; Yang, SQ; Lin, HZ; Costa, S; Hwang, CS; Lane, M; Bagby, G y Diehl, A. (1998) *Bacterial lipopolysaccharide induces uncoupling protein-2 expression in hepatocytes by tumor necrosis factor- $\alpha$ -dependent mechanism*. Biochem Biophys Res Commun, 251: 313-319.
  
  - Chang, YC y Chuang, LM. (2010) *The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication*. Am J Transl Res, 2: 316-331.
  
  - Chapkin, RS; Kim, W; Lupton, JR y McMurray, DN. (2009) *Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation*. Prost Leuk Essen Fatty Acids, 81:187-191.
  
  - Chapman, C; Morgan, L y Murphy, M. (2000) *Maternal and Early Dietary Fatty Acid Intake: Changes in Lipid Metabolism and Liver Enzymes in Adult Rats*. J Nutr, 130: 146-151.



- 
- Cheung, K; Tzamelis, I; Pissios, P; Rovira, I; Gavrilova, O; Ohtsubo, T; Chen, Z; Finkel, T; Flier, J y Friedman, J (2007). *Xanthine Oxidoreductase Is a Regulator of Adipogenesis and PPAR $\gamma$  Activity*. Cell Metab, 5: 115-128.
  
  - Chicco, A; Basabe, JC; Karabatas, L; Ferraris, N; Fortino, A y Lombardo YB. (2000) *Troglitazone (CS-045) normalizes hyper-triglyceridemia and restores the altered patterns of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipidemic rats*. Metabolism, 49: 1346–1351.
  
  - Chicco, A; Bernal, C; Soria, A; Giangrossi, G y Lombardo, YB. (1999) *Dietary effects of parcial or total substitution of sucrose for starch on glucose and lipid metabolism in dyslipemic rats*. Nutr Res, 19: 281-293.
  
  - Chicco, A; D'Alessandro, ME; Karabatas, L; Pastorale, C; Basabe, JC y 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; Rossi, A; Lombardo, YB; Lacorte, JM; Rouault, C; Slama, G y Ríscala, S. (2005) *Proteínas desacoplantes (UCPs), adiposidad y resistencia insulínica (RI)*. 50 Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Clínicas. Mar del Plata, Argentina, 29 de Noviembre al 2 de Diciembre de 2005. Medicina, vol. 65, pp. 100.
  
  - Chow, CK; Reddy, K y Tappel, AL. (1973) *Effect of Dietary Vitamin E on the Activities of the Glutathione Peroxidase System in Rat Tissues*. J Nutr, 103: 618-624.
  
  - D'Alessandro, ME; Chicco, A; Karabatas, L y 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.
  
  - D'Alessandro, ME; Chicco, A y Lombardo, YB. (2008) *Dietary fish oil reverses lipotoxicity, altered glucose metabolism, and nPKC epsilon translocation in the heart of dyslipemic insulin-resistant rats*. Metabolism, 57: 911-919.



- 
- Das, U. (2002) *Is Metabolic Síndrome X an Inflammatory Condition?*. Exp Biol Med, 227: 989-997.
  
  - Davidson, M y Karjala, R. (1970) *Simplified fluorometric method for the determination of plasma glycerol*. J Lipid Res, 11: 609-612.
  
  - De Craemer, D; Vamecq, J; Roels, E; Vallte, L; Pauwels, M y Van den Branden, C. (1994) *Peroxisomes in liver, heart, and kidney of mice fed a commercial fish oil preparation: original data and review on peroxisomal changes induced by high-fat diets*. J Lipid Res, 35: 1241-1250.
  
  - De Fronzo, RA; Tobin, JD y Andres, R. (1979) *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance*. Am J Physiol, 237: 214-223.
  
  - De Souza, CT; Araujo, EP; Stoppiglia, LF; Pauli, JR; Ropelle, E; Rocco, SA; Marin, RM; Franchini, KG; Carvalheira, JB; Saad, MJ; Boschero, AC; Carneiro, EM y Velloso, LA. (2007) *Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action*. FASEB J, 21: 1153-1163.
  
  - Delporte, ML; Funahashi, T; Takahashi, M; Matsuzawa, Y y Brichard, SM. (2002) *Pre- and post-translational negative effect of beta-adrenoceptor agonists on adiponectin secretion: in vitro and in vivo studies*. Biochem J, 367: 677-685.
  
  - Desco, MC; Asensi, M; Marquez, R; Martinez-Valls, J; Vento, M; Pallardo, F; Sastre, J y Vina, J. (2002) *Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: Protection by allopurinol*. Diabetes, 51:1118-1124.
  
  - Desvergne, B; Michalik, L y Wahli, W. (2006) *Transcriptional Regulation of Metabolism*. Physiol Rev, 86: 465-514.



- 
- Di Girolamo, M; Mendlinger, S y Fertig, JW. (1971) *A simple method to determinate fat cell size and number in four mammalian species*. Am J Physiol, 221: 850-858.
  
  - Din, JN; Newby, DE y Flapan, AD. (2004) *Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease-fishing for a natural treatment*. Br Med J, 328: 30-35.
  
  - Drogue, W. (2002) *Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function*. Physiol Rev, 82: 47-95.
  
  - Erdogan, H; Fadillioglu, E; Ozgocmen, S; Sogut, S; Ozyurt, B; Akyol, O y Ardicoglu, O. (2004) *Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats*. Prost Leuk Essen Fatty Acids, 71: 149-152.
  
  - Evans, R; Barish, G y Wang, YX. (2004) *PPARs and the complex journey to obesity*. Nat Med, 10: 1-7.
  
  - Fantuzzi, G. (2005) *Adipose tissue, adipokines, and inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 115: 911-919.
  
  - Fasshauer, M; Klein, J; Neumann, S; Eszlinger, M y Paschke, R (2001) *Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes*. FEBS Lett, 507:142-146.
  
  - Federici, M; Hubal, M; Perego, L; Ranalli, M; Caradona, Z; Perego, C; Usellini, L; Nano, R; Bonini, P; Bertuzzi, F; Marlier, LN; Davalli, AM; Carandente, O; Pontiroli, AE; Mellino, G; Marchetti, P; Lauro, R; Sesti, G y Folli, F. (2001) *High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: A potential role for regulation of specific Bcl family genes toward apoptotic cell death program*. Diabetes, 50: 1290-1301.
  
  - Ferranti, S y Mozaffarian, D. (2008) *The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences*. Clin Chem, 54: 945-955.



- 
- Ferré, P. (2004) *The Biology of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Relationship With Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity*. Diabetes, 53: S43-S50.
  
  - Flachs, P; Horakova, O; Brauner, P; Rossmeisl, M; Pecina, P; Franssen-van Hal, N; Ruzickova, J; Sponarova, J; Drahotka, Z; Vlcek, C; Keijer, J; Houstek, J y Kopecky, J. (2005) *Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce  $\beta$ -oxidation in white fat*. Diabetologia, 48: 2365-2375.
  
  - Fleury, C; Neverova, M; Collins, S; Raimbault, S; Champigny, O; Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., Ricquier, D., y Warden, CH. (1997) *Uncoupling protein-2: A novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia*. Nat Genet, 15: 269-272.
  
  - Folch, J; Lees, M y Sloane Stanley GH. (1957) *A Simple Method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. J Biol Chem, 226: 497-509.
  
  - Frühbeck, G; Gomez-Ambrosi, J; Muruzabal, FJ y Burrell, MA. (2001) *The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 280: E827-E847.
  
  - Frühbeck, G. (2006) *Intracellular signalling pathways activated by leptin*. Biochem J, 393: 7–20.
  
  - Furukawa, S; Fujita, T; Shimabukuro, M; Iwaki, M; Yamada, Y; Nakajima, Y; Nakayama, O; Makishima, M; Matsuda, M; y Shimomura, I. (2004) *Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome*. J Clin Invest, 114: 1752–1761.
  
  - Gagliardino, JJ. (2000) *An overview of Argentine contributions to diabetes research in the decade of the 1990s*. Diabetes Metab Res Rev, 16: 43-60.



- 
- Galic, S; Oakhill, J y Steinberg, G. (2010) *Adipose tissue as an endocrine organ*. Mol Cell Endocrinol, 316: 129-139.
  
  - Galinier, A; Carrière, A; Fernandez, Y; Carpené, C; André, M; Caspar-Bauguil, S; Thouvenot, JP; Périquet, B y Cateilla L. (2006a) *Adipose Tissue Preadipogenic Redox Changes in Obesity*. J Biol Chem, 281: 12682-12687.
  
  - Galinier, A; Carriere, A; Fernandez, Y; Caspar-Bauguil, S; Periquet, B; Periquet, A; Penicaud, L y Casteilla, L. (2006b). *Site specific changes of redox metabolism in adipose tissue of obese Zucker rats*. FEBS Lett, 580: 6391-6398.
  
  - Girard, A; Madani, S; El Boustani, ES; Belleville, J y Prost, J. (2005) *Changes in lipid metabolism and antioxidant defense status in spontaneously hypertensive rats and Wistar rats fed a diet enriched with fructose and saturated fatty acids*. Nutrition, 21: 240-248.
  
  - Godber, B; Doel, J; Sapkota, G; Blake, D; Stevens, C; Eisenthal, R y Harrison, R. (2000) *Reduction of Nitrite to Nitric Oxide Catalyzed by Xanthine Oxidoreductase*. J Biol Chem, 275: 7757-7763.
  
  - Goldrick, RB. (1967) *Morphological changes in adipocyte timing of fat deposition and mobilization*. Am J Physiol, 212: 777-782.
  
  - Griffith, OW. (1980) *Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine*. Anal Biochem, 106: 207–212.
  
  - Gurnell, M. (2007) *'Striking the Right Balance' in Targeting PPAR $\gamma$  in the Metabolic Syndrome: Novel Insights from Human Genetic Studies*. PPAR Research 2007: 83593.
  
  - Gustafson, B; Jack, MM; Cushman, SW y Smith, U. (2003) *Adiponectin gene activation by thiazolidinediones requires PPAR gamma 2, but not C/EBP alpha-evidence for differential regulation of the aP2 and adiponectin genes*. Biochem Biophys Res Commun, 308: 933-939.



- 
- Gutman, R; Basílico, MZ; Bernal, C; Chicco, A y Lombardo, YB. (1987) *Long-Term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose rich diet*. *Metabolism*, 36: 1013-1020.
  
  - Hajer, G; van Haeften, T y Visseren, F. (2008) *Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases*. *Eur Heart J*, 29: 2959-2971.
  
  - Halleux, CM; Takahashi, M; Delporte, ML; Detry, R; Funahashi, T; Matsuzawa, Y y Brichard, SM. (2001) *Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue*. *Biochem Biophys Res Commun*, 288: 1102–1107.
  
  - Haque, MS; Minokoshi, Y; Hamai, M; Iwai, M; Horiuchi, M y Shimazu, T. (1999) *Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats*. *Diabetes*, 48: 1706-1712.
  
  - Harris, WS; Hustvedt, BE; Haegen, E; Green, MH; Lu, G y Drevon, CA. (1997) *N-3 fatty acids and chylomicron metabolism in the rat*. *J Lipid Res*, 38: 503-515.
  
  - Haug, A y Hostmark, AT. (1987) *Lipoprotein lipases, lipoproteins and tissue lipids in rats fed fish oil or coconut oil*. *J Nutr*, 117: 1011–1017.
  
  - Havel, PJ. (2001) *Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis*. *Exp Biol Med*, 226: 963-977.
  
  - Havel, PJ. (2004) *Update on Adipocyte Hormones: Regulation of Energy Balance and Carbohydrate/Lipid Metabolism*. *Diabetes*, 53: S143-S151.
  
  - Hein, GJ; Bernasconi, AM; Montanaro, MA; Pellon-Maison, M; Finarelli, G; Chicco, A; Lombardo, YB y Brenner, RR. (2010) *Nuclear receptors and hepatic lipidogenic enzyme response to a dyslipidemic sucrose-rich diet and its reversal by fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298: E429-E439.



- 
- Herbert, V; Lau, KS; Gottlieb, CH y Bleicher, S. (1965) *Coated charcoal immunoassay of insulin*. J Clin Endocrinol Metab, 25: 1375-1384.
  
  - Hill, JO; Peters, JC; Lin, D; Yakubu, F; Greene, H y Swift L. (1993) *Lipid accumulation and body fat distribution is influenced by type of dietary fat fed to rats*. Int J Obes Relat Metab Disord, 17: 223-236.
  
  - Holm, C; Osterlund, T; Laurell, H y Contreras, JA. (2000) *Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis*. Annu Rev Nutr, 20: 365-393.
  
  - Horn, HD. (1974). *Ghlutathione Reductase*. In *methods of Enzimatic Analysis*. (2nd ed.), (editado por Bergmeyer, HU). Academic Press. New York, 875-879.
  
  - Horowitz, J. (2003) *Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise*. Tr Endocrinol Metab, 14: 386-392.
  
  - Hotamisligil, GS; Arner, P; Caro, JF; Atkinson, RL y Spiegelman, BM. (1995) *Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 95: 2409-2415.
  
  - Hotamisligil, GS; Shargill, NS y Spiegelman, BM. (1993). *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role of obesity-linked insulin resistance*. Science, 259: 87-91.
  
  - Hsu, CL; Wu, CH; Huang, SL y Yen, GC. (2009) *Phenolic Compounds Rutin and o-Coumaric Acid Ameliorate Obesity Induced by High-Fat Diet in Rats*. Agric Food Chem, 54: 425-431.
  
  - Hun, CS; Hasegawa, K; Kawabata, T; Kato, M; Shimokawa, T y Kagawa Y. (1999) *Increased Uncoupling Protein2 mRNA in White Adipose Tissue, and Decrease in Leptin, Visceral Fat, Blood Glucose, and Cholesterol in KK-Ay Mice Fed with Eicosapentaenoic*



---

*and Docosahexaenoic Acids in Addition to Linolenic Acid.* Biochem Biophys Res Commun, 259: 85-90.

- Iwata, M; Haruta, T; Usui, I; Takata, Y; Takano, A y Uno, T. (2001) *Pioglitazone ameliorates tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance by a mechanism independent of adipogenic activity of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.* Diabetes, 50: 1083-1092.
- Jump, DB; Botolin, D; Wang, Y; Xu, J; Christian, B y Demeure, O, (2005) *Fatty acid regulation of hepatic gene transcription.* J Nutr, 135: 2503–2506.
- Kadowaki, T; Yamauchi, T; Kubota, N; Hara, K; Ueki, K y Tobe, K. (2006) *Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome.* J Clin Invest, 116: 1784-1792.
- Kahn, BB; Alquier, T; Carling, D y Hardie, DG. (2005) *AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism.* Cell Metab, 1: 15-25.
- Kamohara, S; Burcelin, R; Halaas, JL; Friedman, JM y Charron, MJ. (1997) *Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment.* Nature, 389: 374-377.
- Kelley, DS; Taylor, PC; Nelson, GJ; Schmidt, PC; Ferretti, A; Erickson, KL; Yu, R; Chandra, RK y Mackey, BE. (1999) *Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men.* Lipids, 34: 317-324.
- Kelly, L; Vicario, P; Thompson, GM; Candelore, M; Doebber, T; Ventre, J; Wu, MS; Meurer, R; Forrest, M; Conner, M; Cascieri, M y Moller, D. (1998) *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors  $\gamma$  and  $\alpha$  Mediate in Vivo Regulation of Uncoupling Protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) Gene Expression.* Endocrinol, 139: 4920-4927.



- 
- Kim, YJ; Yokozawa, T y Chung, HY. (2005) *Suppression of oxidative stress in aging NZB/NZW mice: effect of fish oil feeding on hepatic antioxidant status and guanidino compounds*. Free Radic Res, 39: 1101-1110.
  
  - Kim, YJ; Tillison, K; Lee, JH; Rearick, D y Smas, C. (2006) *The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF- $\alpha$  in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPAR $\gamma$* . Am J Physiol Endocrinol Metab, 291: E115–E127.
  
  - Kobayashi, H; Matsuda, M; Fukuhara, A; Komuro, R y Shimomura, I. (2009) *Dysregulated glutathione metabolism links to impaired insulin action in adipocytes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 296: E1326–E1334.
  
  - Kriegler, M; Perez, C; DeFay, K; Albert, I y Lu, SD. (1988) *A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF*. Cell, 53: 45-53.
  
  - Kris-Etherton, PM; Harris, WS y Appel, LJ. (2002) *Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease*. Circulation, 106: 2747-2757.
  
  - Kubo, K; Saito, M; Tadokoro, T y Maekawa, A. (1998) *Dietary docosahexaenoic acid dose not promote lipid peroxidation in rat tissue to the extent expected from peroxidizability index of the lipids*. Biosci Biotech Biochem, 62: 1698-1706.
  
  - Laemmli, UK. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227: 680-685.
  
  - Lafontan, M and Berlan, M. (1995) *Fat Cells  $\alpha$ 2-Adrenoceptores: The Regulation of Fat Cell Function and Lipólisis*. Endocrine Reviews, 16: 716-738.



- 
- Lago, F; Dieguez, C; Gómez-Reino, J y Gualillo, O. (2007) *The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses*. Cytokine Growth Factor Rev, 18: 313–325.
  
  - Landström, TR; Mei, J; Karlsson, M; Manganiello, V y Degerman, E, (2000) *Down-regulation of cyclic-nucleotide phosphodiesterase 3B in 3T3-L1 adipocytes induced by tumour necrosis factor alpha and cAMP*. Biochem J, 346: 337-343.
  
  - Langin, D; Holm, C y Lafontan, M. (1996) *Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism*. Proc Nutr Soc, 55: 93-109.
  
  - Laurencikiene, J; van Harmelen, V; Nordström, E; Dicker, A; Blomqvist, L; Näslund, E; Langin, D; Arner, P y Rydén, M. (2007) *NF- $\kappa$ B is important for TNF- $\alpha$ -induced lipolysis in human adipocytes*. J Lipid Res, 48:1069-1077.
  
  - Lee, F; Li, Y; Zhu, H; Yang, S; Lin, H; Trush, M y Diehl, A. (1999) *Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice liver*. Hepatology, 29: 677-687.
  
  - Lee, HS y Csallany, AS. (1987) *Measurement of free and bound malondialdehyde in vitamin E deficient and-supplemented rat liver tissues*. Lipids, 22: 104-107.
  
  - Lee, MJ y Fried, SK. (2006) *Multilevel regulation of leptin storage, turnover and secretion by feeding and insulin in rat adipose tissue*. J Lip Res, 47: 1984-1993.
  
  - Lee, MJ; Wang, Y; Ricci, R; Colleen, D; Russell, CD y Fried, SK. (2007) *Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethasone in human adipose tissue*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 292: 858-864.
  
  - Lee, Y; Kim, AY; Choi, JW; Kim, M; Yasue, S; Son, HJ; Masuzaki, H; Park, KS y Kim, JB (2008). *Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress*. Mol Endocrinol, 22: 2176-2189.



- 
- Liang, H; Yin, B; Zhang, H; Zhang, S; Zeng, Q; Wang, J; Jiang, X; Yuan, L; Wang, CY y Li, Z. (2008) *Blockade of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor Type I-Mediated TNF- $\alpha$  Signaling Protected Wistar Rats from Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance*. *Endocrinol*, 149: 2943-2951.
  
  - Lombardo, YB; Chicco, A; D'Alessandro, ME; Martinelli, M; Soria, A y 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 y 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 y Chicco, A. (2006). *Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans*. *J Nutr Biochem*, 17: 1-13.
  
  - Lombardo, YB; Hein, G y Chicco, A. (2007) *Metabolic Syndrome: Effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity*. *Lipids*, 42: 427-437.
  
  - Lorenzo, C; Williams, K; Hunt, KJ y Haffner, SM. (2007) *The National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III, International Diabetes Federation, and World Health Organization definitions of the metabolic syndrome as predictors of incident cardiovascular disease and diabetes*. *Diabetes Care*, 30: 8-13.
  
  - Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL y Randall, RJ. (1951) *Protein measurement with the folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
  
  - Lück H. (1974). *Catalase. Spectrophotometric Method. In methods of Enzymatic Analysis. (2nd ed.)*, (editado por Bergmeyer, HU). Academic Press. New York. 885-888.



- 
- Luo, J; Rizkalla, SW; Alamowitch, C; Boussairi, A, Blayo, A; Barry, JL; Laffitte, A; Guyon, F; Bornet, F y Slama, G. (1996) *Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides by healthy subjects decreased basal hepatic glucose production but had no effect on insulin-stimulated glucose metabolism*. Am J Clin Nutr, 63: 939-945.
  
  - MacDougald, OA y Burant, CF. (2005) *Obesity and metabolic perturbations after loss of aquaporin 7, the adipose glycerol transporter*. Proc Natl Acad Sci, 102:10759-10760.
  
  - Maeda, K; Okubo, K; Shimomura, I; Funahashi, T; Matsuzawa, Y y Matsubara, K. (1996) *cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)*. Biochem Biophys Res Commun, 221: 286-289.
  
  - Maia, L y Mira, L. (2002) *Xanthine Oxidase and Aldehyde Oxidase: A Simple Procedure for the Simultaneous Purification from Rat Liver*. Arch Biochem Biophys, 400: 48-53.
  
  - Mannucci, E; Monami, M; Bardini, G; Ognibene, A y Rotella, CM. (2007) *National Cholesterol Educational Program and International Diabetes Federation diagnostic criteria for metabolic syndrome in an Italian cohort: results from the FIBAR Study*. J Endocrinol Invest, 30: 925-930.
  
  - Marjani, A; Veghari, G y Badeleh, MT. (2010) *Serum Lipid Peroxidation And Leptin Levels In Male And Female Type 2 Diabetic Patients In Gorgan (South East Of Caspian Sea)*. Iran J Chinese Clin Med, 5: 26-35.
  
  - Martí, R; Varela, E; Pascual, C y Segura, MR. (2001) *Determination of xanthine oxidoreductase forms: influence of reaction conditions*. Clin Chim Acta, 303: 117-125.
  
  - Masaki, T; Yoshimatsu, H; Chiba, S; Hidaka, S; Tajima, D; Kakuma, T; Kurokawa, M y Sakata, T (1999) *Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates in vivo expression of the rat UCP family differentially*. Biochim Biophys Acta, 1436: 585-592.



- 
- Mates, JM; Perez-Gomez, C y Núñez De Castro I. (1999) *Antioxidant enzymes and human diseases*. Clin Biochem, 32: 595-603.
  
  - Maury, E y Britchard, SM. (2010) *Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome*. Mol Cell Endocrinol, 314: 1-16.
  
  - May, JM. (1980) Abnormal total NADP<sup>+</sup> and glutathione and impaired glucose metabolism of large rat adipocytes. FEBS Lett, 18: 133-136.
  
  - McManaman, JL; Shellman, V; Wright, RM y Repine, JE. (1996) *Purification of rat liver xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by affinity chromatography on benzamidine-sepharose*. Arch Biochem Biophys, 332:135-141.
  
  - Medina-Gomez, G; Gray, SL; Yetukuri, L; Shimomura, K; Virtue, S; Campbell, M; Curtis, RK; Jimenez-Linan, M; Blount, M; Yeo, G; Lopez, M; Seppanen-Laakso, T; Ashcroft, F; Oresic, M y Vidal-Puig, A. (2007) *PPAR gamma 2 Prevents Lipotoxicity by Controlling Adipose Tissue Expandability and Peripheral Lipid Metabolism*. PLoS Genet, 3: 634-647.
  
  - Memon, RA; Feingold, KR; Moser, AH; Fuller, J y Grunfeld, C. (1998) *Regulation of fatty acid transport protein and fatty acid translocase mRNA levels by endotoxin and cytokines*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 274: E210-E217.
  
  - Memon, RA; Hotamisligil G; Wiesbrock, S; Uysal, K; Faggioni, R; Moser, A; Feingold, K y Grunfeld, C. (2000) *Upregulation of uncoupling protein 2 mRNA in genetic obesity: lack of an essential role for leptin, hyperphagia, increased tissue lipid content, and TNF-alpha*. Biochim Biophys Acta, 1484: 41-50.
  
  - Mercier, B; Prost, J y Prost, M. (2008) Antioxidant activity of Bol d'Air Jacquier® breathing sessions in Wistar rats-first studies. Int J Occup Med Environ Health, 21: 31-46.
  
  - Meté, N; Isik, B; Erdin, L y Gürkan, F. (1999) *The Effect of Fish Oil on Liver and Plasma MDA and Antioxidant Status of Rats*. Tr J Med Sci, 29: 1-6.



- 
- Millar, TM; Stevens, CR; Benjamin, N; Eisenthal, R; Harrison, R y Blake, DR. (1998) *Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions*. FEBS Lett, 427: 225-228.
  - Minokoshi, Y; Kim, YB; Peroni, OD; Fryer, LG; Muller, C; Carling, D y Kahn, BB. (2002) *Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nature, 415: 339–343.
  - Mohamed-Ali, V; Goodrick, S; Rawesh, A; Katz, DR; Miles, JM; Yudkin, JS; Klein, S y Coppel, SW. (1997) *Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo*. J Clin Endocrinol Metab, 82: 4196–4200.
  - Mori, TA; Burke, V; Puddey, IB; Watts, GF; O'Neal, DN y 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.
  - Mueller, WM; Gregoire, MF; Stanhope, KL; Mobbs, CV; Mizuno, TM; Warden, CH; Stern, JS y Havel, PJ. (1998) *Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes*. Endocrinol, 139: 551-558.
  - Muoio, DM; Dohm, GL; Fiedorek, FT Jr; Tapscott, EB y Coleman, RA. (1997) *Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle*. Diabetes, 46: 1360-1363.
  - Murase, T; Kondo, H; Hase, T; Tokimitsu, I y Saito, M (2001). *Abundant expression of uncoupling protein-2 in the small intestine: up-regulation by dietary fish oil and fibrates*. Biochim Biophys Acta, 1530: 15-22.
  - Murata, M; Kaji, H; Takahashi, Y; Iida, K; Mizuno, I; Okimura, Y; Abe, H y Chihara, K. (2000) *Stimulation by eicosapentaenoic acids of leptin mRNA expression and its secretion in mouse 3T3-L1 adipocyte in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 270: 343-348.



- 
- Muurling, M; Mensink, R; Pij, H; Romijn, J; Havekes, L; Peter, J y Voshol, P. (2003) *A Fish Oil Diet Does Not Reverse Insulin Resistance despite Decreased Adipose Tissue TNF- $\alpha$  Protein Concentration in ApoE-3 Leiden Mice*. J Nutr 133: 3350-3355.
  
  - Nara, M; Kanda, T; Tsukui, S; Inukai, T; Shimomura, Y; Inoue, S y Kobayashi, I. (1999) *Running exercise increases tumor necrosis factor- $\alpha$  secreting from mesenteric fat in insulin-resistant rats*. Life Sci, 65: 237-244.
  
  - Neat, CE; Thomassen, MS y Osmundsen, H. (1981) *Effects of high-fat diets on hepatic fatty acid oxidation in the rat*. Biochem J, 196: 149-159.
  
  - Nordberg, J y Arner, ES. (2001) *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system*. Free Radic Biol Med, 31:1287-1312.
  
  - Ogden, CL; Carroll, MD; McDowell, MA y Flegal, KM. (2007) *Obesity among adults in the United States: no statistically significant change since 2003–2004*. NCHS data brief, 1: 1-8.
  
  - Ogden, CL; Carroll, MD y Flegal, KM. (2008) *High body mass index for age among US children and adolescents, 2003–2006*. JAMA, 299: 2401-2405.
  
  - Okuno, Y; Matsuda, M; Kobayashi, H; Morita, K; Suzuki, E; Fukuhara, A; Komuro, R; Shimabukuro, M y Shimomura I. (2008) *Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPAR $\gamma$ -responsive region*. Biochem Biophys Res Commun, 366: 698-704.
  
  - Ostrowski, J; Klimek-Tomczak, K; Wyrwicz, L; Mikula, M; Schullery, D y Bomsztyk, K. (2004) *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Enhances Insulin-induced Expression of Mitochondrial UCP2 Protein*. J Biol Chem, 279: 54599-54609.
  
  - Ouchi, N y Walsh, K. (2007) *Adiponectin as an anti-inflammatory factor*. Clin Chim Acta, 380: 24-30.



- 
- Paglia, DE y Valentine, WN. (1967) *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase*. J Lab Cm Med, 70: 158-69.
  
  - Pagliassotti, MJ; Prach, PA; Koppenhafer, TA y Pan, DA. (1996) *Changes in insulin action, triglycerides and lipid composition during sucrose feeding in rats*. Am J Physiol, 271: 1319-1326.
  
  - Park, J; Rho, HK; Kim, HK; Choe, SS; Lee, YS y Kim, JB. (2005) *Overexpression of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Is Associated with Lipid Dysregulation and Insulin Resistance in Obesity*. Mol Cell Biol, 25: 5146-5157.
  
  - Parrish, CC; Myher, JJ; Kuksis, A y Angel, A. (1997) *Lipid structure of rat adipocyte plasma membranes following dietary lard and fish oil*. Biochem Biophys Acta, 1323: 253-262.
  
  - Pecqueur, C; Alves-Guerra, MC; Gelly, C; Levi-Meyrueis, C; Couplan, E; Collins, S; Ricquier, D; Bouillaud, F y Miroux, B. (2001) *Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation*. J Biol Chem, 276: 8705–8712.
  
  - Pellmé, F; Smith, U; Funahashi, T; Matsuzawa, Y; Brekke, H; Wiklund, O; Taskinen, MR y Jansson, PA. (2003) *Circulating Adiponectin Levels Are Reduced in Nonobese but Insulin-Resistant First-Degree Relatives of Type 2 Diabetic Patients*. Diabetes, 52: 1182-1186.
  
  - Perez-Matute, P; Marti, A; Martinez, JA; Fernández-Otero, MP; Stanhope, KL; Havel, PJ y Moreno-Aliaga MJ. (2005) *Eicosapentaenoic fatty acid increases leptin secretion from primary cultured rat adipocytes: role of glucose metabolism*. Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol, 288: R1682-R1688.



- 
- Perez-Matute, P; Pérez-Echarri, N; Martínez, JA; Marti, A y Moreno-Aliaga, MJ. (2007) *Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor- $\alpha$* . Br J Nutr, 97: 389-398.
  
  - Peyron-Caso, E; Fluteau-Nadler, S; Kabir, M; Guerre-Millo, M; Quignard-Boulangé, A; Slama, G y Rizkalla, SW. (2002a) *Regulation of glucose transport and transporter 4 (GLUT-4) in muscle and adipocytes of sucrose-fed rats: effects of N-3 poly- and monounsaturated fatty acids*. Horm Metab Res, 34: 360-366.
  
  - Peyron-Caso, E; Taverna, M; Guerre-Millo, M; Véronèse, A; Pacher, N; Slama, G y Rizkalla, SW. (2002b) *Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids up regulate plasma leptin in insulin resistant rats*. J Nutr, 132: 2235-2240.
  
  - Pighín, D; Karabatas, L; Rossi, A; Chicco, A; Basabe, JC y Lombardo, YB. (2003) *Fish Oil Affects Pancreatic Fat Storage, Pyruvate Dehydrogenase Complex Activity and Insulin Secretion in Rats Fed a Sucrose-Rich Diet*. J Nutr, 133: 4095-4101.
  
  - Proscura, AL y Ignatieva, EV. (2002) *Molecular-genetical mechanisms of adipocyte regulation: representation in GeneNet database*. In: Proceedings of the IIIrd International Conf on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure, Novosibirsk, 2: 76-79.
  
  - Qi, C y Pekala, PH. (2000) *Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in adipocytes*. Proc Soc Exp Biol Med, 223:128-135.
  
  - Raclot, T; Groscolas, R; Langin, D y Ferre P. (1997) *Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissue*. J Lipid Res, 38: 1963-1972.
  
  - Reaven, GM; Risser, TR; Chen, YD y Reaven, E. (1979) *Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, non obese rats*. J Lipid Res, 20: 371-378.



- 
- Rebolledo, OR; Marra, CA; Raschia, A; Rodríguez, S y Gagliardino, JJ. (2008) *Abdominal adipose tissue: early metabolic dysfunction associated to insulin resistance and oxidative stress induced by an unbalanced diet*. Horm Metab Res, 40: 794–800.
  
  - Reeves, PG; Nielsen, FH y Fahey, GC Jr. (1993) *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet*. J Nutr, 123: 1939-1951.
  
  - Reilly, J y Thompson, M. (2000) *Dietary fatty acids Up-regulate the expression of UCP2 in 3T3-L1 preadipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 277: 541-545.
  
  - Reseland, JE ; Haugen, F ; Hollung, K ; Solvoll, K; Halvorsen, B; Brude, IR; Nenseter, MS; Christiansen, EN y Drevon, CA. (2001) *Reduction of leptin gene expression by dietary polyunsaturated fatty acids*. J Lip Res, 42: 743-750.
  
  - Roberts, C; Vaziri, N; Wang, X y Barnard, R. (2000) *Enhanced NO Inactivation and Hypertension Induced by a High-Fat, Refined-Carbohydrate Diet*. Hypertension, 36: 423-429.
  
  - Rodbell, M. (1964). *Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis*. J Biol Chem, 239: 375-380.
  
  - Roh, C; Thoidis, G; Farmer, S y Kandror, K. (2000) *Identification and characterization of leptin-containing intracellular compartment in rat adipose cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 279: E893-E899.
  
  - Rossi, AS; Lombardo, YB y Chicco, A. (2010) *Lipogenic enzyme activities and glucose uptake in fat tissue of dyslipemic, insulin-resistant rats: effects of fish oil*. Nutrition, 26: 209-217.
  
  - Rossi, AS; Lombardo, YB; Lacorte, JM; Chicco, A; Rouault, C; Slama, G y Rizkalla, SW. (2005) *Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in*



- sucrose-fed, insulin-resistant rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 289: R486-R494.
- Ruan, H y Lodish, HF. (2003) *Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor*. Cytokine Growth Factor Rev, 14: 447-455.
  - Ruan, H; Pownall, HJ y Lodish, HF. (2003) *Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor-alpha-induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF-kappaB*. J Biol Chem, 278: 28181-28192.
  - Russell, CD; Ricci, MR; Brolin, RE; Magill, E y Fried, SK. (2001) *Regulation of the leptin content of obese human adipose tissue*. Am J Physiol Endocrinol Metab 280: E399-E404.
  - Sabio, G; Das, M; Mora, A; Zhang, Z; Jun, JY; Ko, HJ; Barrett, T; Kim, JK y Davis, RJ. (2008) *A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance*. Science, 322: 1539-1543.
  - Saito, M y Kubo, K. (2003) *Relationship between tissue lipid peroxidation and peroxidizability index after a-linolenic, eicosapentaenoic, or docosahexaenoic acid intake in rats*. Br J Nutr, 89: 19-28.
  - Saleh, M; Wheeler, M y Chan, C. (2002) *UCP2: evidence for its function as a metabolic regulator*. Diabetología, 45: 174-187.
  - Sandoval, AG; Manssur, F; Gómez, D y Gómez C. (2009) *Receptores nucleares y metabolismo de lípidos: implicaciones cardiovasculares*. Revista Colombiana de Cardiología, 16: 29-34.
  - Sarrasague, MM; Barrado, DM; Zubillaga, M; Hager, A; De Paoli, T y Boccio, J. (2006) *Conceptos actuales del metabolismo del glutatión Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis*. Acta bioquím. clín. Latinoam, 40: 45-51.



- 
- Scherer, PE; Williams, S; Fogliano, M; Baldini, G y Lodish, HF. (1995) *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes*. J Biol Chem, 270: 26746-26749.
  - Scherer PE. (2003) *The role of adiponectine in carbohydrate and lipid metabolism*. Endocrine Abstract, 5: S20.
  - Sekine, S; Kubo, K; Tadokoro, T; Maekawa, A y Saito, M. (2003) *Dietary docosahexaenoic acid-induced production of tissue lipid peroxides is not suppressed by higher intake of ascorbic acid in genetically scorbutic Osteogenic Disorder Shionogi/Shiod/od rats*. Br J Nutr, 90: 385-394.
  - Sethi, JK y Hotamisligil, GS. (1999) *The role of TNF $\alpha$  in adipocyte metabolism*. Semin Cell Dev Biol, 10: 19-29.
  - Sethi, JK y Vidal-Puig, AJ. (2007) *Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation*. J Lipid Res, 48: 1253-1262.
  - Sharma, AM y Staels B. (2007) *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  and Adipose Tissue-Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism*. J Clin Endocrinol Metab, 92: 386-395.
  - Shintani, M; Nishimura, H; Yonemitsu, S; Masuzaki, H; Ogawa, Y; Hosoda, K; Inoue, G; Yoshimasa, Y y Nakao K. (2000) *Downregulation of leptin by free fatty acids in rat adipocytes: effects of triacsin C, palmitate, and 2-bromopalmitate*. Metabolism, 49: 326-330
  - Shoelson, SE; Herrero, L y Naaz, A. (2007) *Obesity, inflammation, and insulin resistance*. Gastroenterology, 132: 2169-2180.



- 
- Sinnott-Smith, PA y Waddington, D. (1992) *Size distribution of adipocytes and variation in adipocyte number in lines of mice selected for high or low body fat*. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*, 102: 573-578.
  
  - Smith, U; Gogg, S; Johansson, A; Olausson, T; Rotter, V y Svalstedt, B. (2001) *Thiazolidinediones (PPARgamma agonists) but not PPARalpha agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes*. *FASEB J*, 15: 215-220.
  
  - Snedecor, GW y Cochran, WG. (1967) *Statistical methods applied to experimental in agriculture and biology*. Iowa State University Press, Ames, IA, USA.
  
  - Sohet, FM; Neyrinck, A; Pachikian, BD; de Backer, FC; Bindels, LB; Niklowitz, P; Menke, T; Cani, P y Delzenne, NM. (2009) *Coenzyme Q10 supplementation lowers hepatic oxidative stress and inflammation associated with diet-induced obesity in mice*. *Biochem Pharmacol*, 78: 1391-1400.
  
  - Soria, A; Chicco, A; D'Alessandro, ME; Rossi, A y Lombardo YB. (2002) *Dietary fish oil reverse epididymal tissue adiposity, cell hypertrophy and insulin resistance in dyslipemic sucrose fed rat model*. *J Nutr Biochem*, 13: 209-218.
  
  - Soria, A; D'Alessandro, ME; y 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.
  
  - Statnick, MA; Beavers, LS; Conner, LJ; Corominola, H; Johnson, D; Hammond, CD; Rafaeloff-Phail, R; Seng, T; Suter, TM; Sluka, JP; Ravussin, E; Gadski, RA y Caro, JF. (2000) *Decreased expression of apM1 in omental and subcutaneous adipose tissue of humans with type 2 diabetes*. *Int J Exp Diabetes Res*, 1: 81-88.
  
  - Storlien, LH; Hulbert, AJ y Else PL. (1998) *Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 1: 559-563.



- 
- Subauste, A y Burant, C. (2007) *Role of FoxO1 in FFA-induced oxidative stress in adipocytes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 293: E159-E164.
  - Surwit, R; Wang, S; Petro, A; Sanchis, D; Raimbault, S; Ricquier, D y Collins, S. (1998) *Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity prone and obesity-resistant strains of mice*. Proc Natl Acad Sci, 95: 4061-4065.
  - Tandogan, B y Ulusu, N. (2006) *Kinetic Mechanism and molecular properties of glutathione reductase*. FABAD J Pharmacol Sci, 31: 230-237.
  - Thirunavukkarasu, V; Nandhini, AT y Anuradha, CV. (2003) *Lipoic acid restores antioxidant system in tissues of hyperinsulinaemic rats*. Indian J Med Res, 118: 134-140.
  - Thomás-Moyá, E; Gómez-Pérez, Y; Fiol, M; Gianotti, M; Lladó, I y Proenza, A. (2008) *Gender Related Differences in Paraoxonase I Response to High-fat Diet-induced Oxidative Stress*. Obesity, 16: 2232-2238.
  - Thompson, MP y Kim, D. (2004) *Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs*. FEBS Lett, 568: 4-9.
  - Torre-Villalvazo, I; Tovar, AR; Ramos Barragán, VE; Cerbón-Cervantes, MA y Torres, N. (2008) *Soy Protein Ameliorates Metabolic Abnormalities in Liver and Adipose Tissue of Rats Fed a High Fat Diet*. J Nutr, 138: 462-468.
  - Trayhurn, P y Wood, IS. (2004) *Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue*. Br J Nutr, 92: 347-355.
  - Unger, RH. (2002) *Lipotoxic diseases*. Annu Rev Med, 53: 319-336.



- 
- Valls, V; Goicoechea, M; Muñiz, P; Saez, GT y Cabo, JR. (2003) *Effect of corn oil and vitamin E on the oxidative status of adipose tissues and liver in rat*. Food Chem, 81: 281-286.
  - Vettor, R; Milan, G; Rossato, M y Federspil, G. (2005) *Adipocytokines and insulin resistance*. Aliment Pharmacol Ther, 22: 3-10.
  - Vidal-Puig, AJ; Considine, RV; Jimenez-Linan, M; Werman, A; Pories, WJ; Caro, JF y Flier, JS. (1997) *Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids*. J Clin Invest, 99: 2416-2422.
  - Vorbach, C; Harrison, R y Capecchi, M. (2003) *Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system*. TRENDS Immun, 24: 512-517.
  - Vozarova, B; Weyer, C; Hanson, K; Tataranni, PA; Bogardus, C y Pratley, RE. (2001) *Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion*. Obesity Res, 9: 414-417.
  - Vrāna, A; Zak, A y Kazdova, L. (1988) *Inhibition of sucrose induced hypertriglyceridemia and increase of the adipose tissue insulin response by dietary n-3 fatty acids in the rat*. Nutr Rep Int, 38: 687-690.
  - Wang, HJ; Jin, YX; Shen, W; Neng, J; Wu, T; Li, YJ y Fu, ZW. (2007) *Low dose streptozotocin (STZ) combined with high energy intake can effectively induce type 2 diabetes through altering the related gene expression*. Asia Pac J Clin Nutr, 16: 412-417.
  - Wellen, KE y Hotamisligil GS. (2005) *Inflammation, stress, and diabetes*. J Clin Invest, 115: 1111-1119.
  - Winkler, G; Kiss, S; Keszthelyi, L; Sapi, Z; Ory, I; Salamon, F; Kovacs, M; Braga, P; Szekeres, O; Speer, G; Karadi, I; Sikter, M; Kaszas, E; Dworak, O; Gero, G y Cseh, K.



- (2003) *Expression of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF- $\alpha$ , soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C peptide level.* Eur J Endocrinol, 149: 129-135.
- Yamauchi, T; Kamon, J; Waki, H; Terauchi, Y; Kubota, N; Hara, K; Mori, Y; Ide, T; Murakami, K; Tsuboyama-Kasaoka, N; Ezaki, O; Akanuma, Y; Gavrilova, O; Vinson, C; Reitman, ML; Kagechika, H; Shudo, K; Yoda, M; Nakano, Y; Tobe, K; Nagai, R; Kimura, S; Tomita, M; Froguel, P y Kadowaki, T. (2001) *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity.* Nat Med, 7: 941-946.
- Yamauchi, T; Kamon, J; Ito, Y; Tsuchida, A; Yokomizo, T; Kita, S; Sugiyama, T; Miyagishi, M; Hara, K; Tsunoda, M; Murakami, K; Ohteki, T; Uchida, S; Takekawa, S; Waki, H; Tsuno, NH; Shibata, Y; Terauchi, Y; Froguel, P; Tobe, K; Koyasu, S; Taira, K; Kitamura, T; Shimizu, T; Nagai, R y Kadowaki, T. (2003) *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.* Nature, 423: 762-769.
- Yamauchi, T; Nio, Y; Maki, T; Kobayashi, M; Takazawa, T; Iwabu, M; Okada-Iwabu, M; Kawamoto, S; Kubota, N; Kubota, T; Ito, Y; Kamon, J; Tsuchida, A; Kumagai, K; Kozono, H; Hada, Y; Ogata, H; Tokuyama, K; Tsunoda, M; Ide, T; Murakami, K; Awazawa, M; Takamoto, I; Froguel, P; Hara, K; Tobe, K; Nagai, R; Ueki, K y Kadowaki, T. (2007) *Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions.* Nat Med, 13: 332-339.
- Yamazaki, RK; Shen, T y Scade, GB. (1987) *A diet rich in (n-3) fatty acids increases peroxisomal  $\beta$ -oxidation activity and lowers plasma triacylglycerols without inhibiting glutathione-dependent detoxification activities in the rat liver.* Biochim Biophys Acta, 920: 62-67.
- Yeaman, S. (1990) *Hormone-sensitive lipase - A multipurpose enzyme in lipid metabolism.* Biochim Biophys Acta, 1052: 128-132.



- Yu, YH y Ginsberg, H. (2005) *Adipocyte Signaling and Lipid Homeostasis. Sequelae of Insulin-Resistant Adipose Tissue*. *Circ Res*, 96: 1042-1052.
  
- Zhang, H; Halbleib, M; Ahmad, F; Manganiello, V y Greenberg, AS. (2002) *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Stimulates Lipolysis in Differentiated Human Adipocytes Through Activation of Extracellular Signal-Related Kinase and Elevation of Intracellular cAMP*. *Diabetes*, 51: 2929-2935.
  
- Zhang, Y; Proenca, R; Maffei, M; Barone, M; Leopold, L y Friedman, JM. (1994) *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. *Nature*, 372: 425-432.

**PUBLICACIONES, PRESENTACIONES A  
CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS**



## **PUBLICACIONES**

- Increased leptin storage with altered leptin secretion from adipocytes of rats with sucrose-induced dyslipidemia and insulin resistance: effect of dietary fish oil (2010). Dante Selenscig, Andrea Rossi, Adriana Chicco, Yolanda B. Lombardo. *Metabolism Clinical and Experimental* vol. 59, pages 787-795. ISSN: 1532-8600.
- Estado oxidativo y contenido de leptina en el tejido adiposo de ratas alimentadas crónicamente con una dieta rica en sacarosa (2010). Dante Selenscig, Adriana Chicco, Yolanda B. Lombardo. *Revista FABICIB* (en prensa). ISSN: 0329-5559.
- Effect of n-3 PUFAs on uncoupling protein 2 (UCP2), peroxisome proliferator activator receptor  $\gamma$  and oxidative stress in adipose tissue of dyslipemic insulin resistant rats. Dante Selenscig, Adriana Chicco, Yolanda B. Lombardo. *Metabolism Clinical and Experimenta.* (en evaluación). ISSN: 1532-8600.
- Soya protein ameliorates the metabolic abnormalities of dysfunctional adipose tissue of dyslipidaemic rats fed a sucrose-rich diet (2010). María E. Oliva, Dante Selenscig, María E. D'Alessandro, Adriana Chicco, Yolanda B. Lombardo. *British Journal of Nutrition* (en prensa). ISSN: 0007-1145.

## **PRESENTACIONES A CONGRESOS Y REUNIONES CIENTIFICAS**

### **Congresos Internacionales**

- **27th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DIABETES AND NUTRITION.** June 25th – 28th 2009: Soy protein improves visceral adiposity and insulin sensitivity in dyslipemic rats fed a sucrose rich diet. YB. Lombardo, D. Selenscig, ME. Oliva, ME. D'Alesandro, A. Chicco. Poster. Postdam, Germany. Diabetes and Nutrition Study Group (DNSG) of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Publicado en el Libro de Resúmenes, Pag. 59.



---

### Congresos Nacionales

- **XVII CONGRESO ARGENTINO DE DIABETES.** 21 y 23 de octubre de 2010: La proteína de soja dietaria mejora mecanismos involucrados en el desarrollo de adiposidad de ratas dislipémicas insulino resistentes. Oliva ME, Selenscig D, Chicco A, Lombardo YB. Poster. Mar del Plata, Argentina.  
Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes, vol. 44, número 4. ISSN: 0325-5247. 2010.
- **XVI CONGRESO ARGENTINO DE DIABETES.** 10 a 12 de octubre de 2008: Regulación de la secreción de leptina en adipocitos aislados de ratas dislipémicas insulino resistentes (IR). Rol de los PPAR $\gamma$ . Efecto de los ácidos grasos polinosaturados N-3 (PUFAs). Selenscig D, Chicco A, Rossi A, Lombardo YB. Poster. Buenos Aires, Argentina  
Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes, vol. 42, número 2. ISSN: 0325-5247. 2008.
- **JORNADAS LÍPIDOS 2008.** 7 y 8 de agosto de 2008: Regulación de la secreción de leptina en adipocitos aislados de ratas dislipémicas insulino resistentes (IR). Efecto de los ácidos grasos polinosaturados (PUFAs) n-3. Selenscig D., Rossi A., Chicco A., Lombardo YB. Comunicación Oral. Rosario, Argentina.
- **LIII Reunión Científica Anual de Sociedad Argentina de Investigación Clínica - Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS).** 19 al 22 de Noviembre de 2008: Efecto de la sustitución de la fuente proteica sobre la adiposidad visceral en ratas dislipémicas, insulino resistentes (IR). D'Alessandro, M. Eugenia; Selenscig, Dante; Oliva, Eugenia; Chicco, Adriana. Poster. Mar del Plata, Argentina.  
Medicina vol. 68 (SUPL. II), Pag. 128, ISSN: 0025-7680. 2008.