

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



**Departamento de Ciencias Biológicas**  
**Laboratorio de Enfermedades Metabólicas relacionadas con la**  
**Nutrición**

**Tesis para la obtención del grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas**

***“INTERVENCIONES NUTRICIONALES EN UN MODELO  
EXPERIMENTAL DE DISLIPEMIA Y RESISTENCIA INSULÍNICA  
INDUCIDO POR INGESTA PROLONGADA DE DIETA RICA EN  
SACAROSA. EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN PARCIAL DEL  
CONTENIDO DE SACAROSA DIETARIA”***

**Tesista: Bioquímica María Alejandra Fortino**

**Directora: Dra. Adriana G. Chicco**

**Codirectora: Dra. Yolanda Bolzón de Lombardo**

**AÑO 2007**

*A Roberto, mi compañero en la vida*

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente Tesis fue llevada a cabo con subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Universidad Nacional del Litoral, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas): PICTO # 05-13260/BID 1728/ OC-AR; CAI+D # 021-133, 2005; CONICET # PIP 5619; y la asistencia financiera recibida de la Fundación A.J. Roemmers (Argentina).

Agradezco a todos los que han colaborado en la realización de este trabajo de tesis y en especial a:

- Mi Directora Dra Adriana Chicco y mi Codirectora Dra Yolanda Lombardo por brindarme la posibilidad de realizar mi Tesis Doctoral en nuestro Laboratorio y por el compromiso, dedicación y responsabilidad con que contribuyeron a este trabajo y a mi formación.
- A los Dres Juan Carlos Basabe y Liliana Karabatas del Servicio de Endocrinología del Hospital Ricardo Gutierrez (Bs As) por su colaboración y orientación en los trabajos conjuntos.
- A los Profesores de la Cátedra de Bromatología y Nutrición (FBCB-UNL) Dres Claudio Bernal y María Estela Fontanarrosa por su buena predisposición ante mis inquietudes en áreas de su conocimiento.
- A mi familia, que me acompañó y apoyó en todo momento.
- A todos mis compañeros y amigos de trabajo: docentes, no docentes, técnicos y tesistas, con quienes he compartido estos años de trabajo y me han brindado su valiosa colaboración y apoyo. Mi especial recuerdo es para la Dra Ana María Soria por su cariñoso aliento en este camino.

## ÍNDICE

	Página
▪ <b>Abreviaturas</b> .....	1
▪ <b>Tablas y Figuras</b> .....	2
▪ <b>Resumen</b> .....	5
▪ <b>Summary</b> .....	7
▪ <b>Introducción</b>	
I- El Síndrome Plurimetabólico.....	9
II- Modelos Experimentales Animales.....	10
1. Modelos genéticos experimentales de dislipemia, resistencia insulínica y diabetes tipo 2 asociada a obesidad. ....	11
2. Modelos experimentales de resistencia insulínica, dislipidemia y anormal homeostasis a la glucosa o diabetes tipo 2 por manipulación nutricional.....	13
III- La Dieta Rica en Sacarosa.....	15
1. Generalidades del metabolismo de la fructosa.....	15
2. Efecto de la fructosa en el hombre .....	18
3. Efecto de la dieta rica en sacarosa en animales de experimentación .....	20
▪ <b>Objetivos</b> .....	24
▪ <b>Materiales y Métodos</b>	
I- Animales de experimentación y tratamientos dietarios.....	26
II- Obtención de muestras de sangre y tejidos .....	29
III- Procedimientos experimentales.....	30
IV- Reactivos.....	41
V- Análisis estadístico de los datos experimentales.....	41
▪ <b>Resultados</b>	
I- <b>Primera parte:</b> Estudio a diferentes tiempos de ingesta.....	42
1. Ingesta calórica, incremento de peso y eficiencia.....	43
2. Peso de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal....	46
3. Niveles de Triglicéridos (TG) y Ácidos Grasos No Esterificados (AGNE) plasmáticos.....	46

	<b>Página</b>
4. Niveles de Glucosa (G) e Insulina (I) plasmáticos .....	<b>49</b>
5. Contenido de triglicéridos hepáticos y musculares.....	<b>49</b>
<b>II. Segunda parte: Estudios bioquímicos- metabólicos .....</b>	<b>54</b>
1. Composición de la carcasa .....	<b>55</b>
2. Actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) en tejido adiposo epididimal .....	<b>59</b>
3. Mecanismos involucrados en la hipertrigliceridemia. Estudios “in vivo” .....	<b>61</b>
3.1. Estudio “in vivo” de la secreción hepática de VLDL-TG.	<b>61</b>
3.2. Remoción de triglicéridos plasmáticos: test de toleran <u>ç</u> cia grasa .....	<b>61</b>
4. Homeostasis de la glucosa y secreción insulínica en islotes pancreáticos.....	<b>65</b>
4.1. Homeostasis de la glucosa .....	<b>65</b>
4.2. Secreción de insulina en islotes pancreáticos.....	<b>65</b>
▪ <b>Discusión</b> .....	<b>71</b>
▪ <b>Conclusión</b> .....	<b>84</b>
▪ <b>Bibliografía</b> .....	<b>86</b>
▪ <b>Publicaciones, Presentaciones a Congresos y Reuniones Científicas .....</b>	<b>100</b>

## **ABREVIATURAS**

**AGNE:** ácidos grasos no esterificados

**AHA:** Asociación Cardiológica Americana

**DAG:** diacilglicerol

**DC:** dieta control

**DRS:** dieta rica en sacarosa

**ECV:** enfermedad cardiovascular

**FAS:** ácido graso sintetasa

**GLUT:** transportador de glucosa

**GS:** glucógeno sintetasa

**IG:** índice glucémico

**IRI:** insulina inmunoreactiva

**IRS:** sustrato receptor de insulina

**K<sub>2</sub>:** constante de velocidad fraccional de remoción grasa

**LPL:** lipoproteína lipasa

**LXR:** receptor nuclear hepático X de hormonas

**NECP:** Programa Nacional de Educación en Colesterol

**PDH:** piruvato dehidrogenasa

**PI3K:** fosfatidilinositol 3-quinasa

**PPAR:** receptores nucleares activadores de la proliferación peroxisomal

**PUFA:** ácidos grasos polinsaturados

**SCD:** estearoil -CoA desaturasa

**SGLT1:** transportador intestinal de glucosa dependiente de sodio

**SREBP:** proteína de unión al elemento receptor de esteroides

**TG:** triglicéridos

**TH:** tejido húmedo

**UCP:** proteína desacoplante

**VLDL:** lipoproteína de muy baja densidad

**VSTG:** velocidad de secreción hepática de triglicéridos

## TABLAS Y FIGURAS

### Tablas

	Página
<b>Tabla 1.</b> Composición de las dietas experimentales expresada como g/ 100g de dieta en base seca (p/p) y como porcentaje de las calorías totales (%E).....	27
<b>Tabla 2.</b> Peso de los tejidos adiposos epididimal <b>(2A)</b> y retroperitoneal <b>(2B)</b> expresados en forma relativa al peso corporal (g/100 g) en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales..	47
<b>Tabla 3.</b> Contenido de triglicéridos en músculo esquelético (gastrocnemio) <b>(3A)</b> y músculo cardíaco <b>(3B)</b> de ratas alimentadas con las diferentes dietas experimentales ..	52
<b>Tabla 4.</b> Composición de la carcasa en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales a las 42 semanas de ingesta.....	56
<b>Tabla 5.</b> Contenido de Glucógeno y actividad Glucógeno Sintasa (GS) en músculo esquelético gastrocnemio de los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales a las 42 semanas de ingesta .....	67

## **Figuras**

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Metabolismo hepático de la fructosa y la glucosa .....	<b>17</b>
<b>Figura 2.</b> Diseño experimental .....	<b>28</b>
<b>Figura 3.</b> Ganancia de peso de los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales .....	<b>44</b>
<b>Figura 4.</b> Modificaciones de la ingesta calórica de los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales.....	<b>45</b>
<b>Figura 5.</b> Niveles de triglicéridos (TG) y ácidos grasos no esterificados (AGNE) plasmáticos en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales.....	<b>48</b>
<b>Figura 6.</b> Niveles de glucemia e insulinemia en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales.....	<b>50</b>
<b>Figura 7.</b> Contenido de triglicéridos hepáticos en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales .....	<b>51</b>
<b>Figura 8.</b> Relación entre el peso del tejido adiposo retroperitoneal y el contenido de grasa de la carcasa en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales a las 42 semanas de ingesta .....	<b>57</b>
<b>Figura 9.</b> Relación entre el peso corporal y el peso del tejido adiposo epididimal en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales a las 42 semanas de ingesta.....	<b>58</b>

	<b>Página</b>
<b>Figura 10.</b> Relación entre el peso corporal y el peso del tejido adiposo retroperitoneal en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales a las 42 semanas de ingesta .....	<b>58</b>
<b>Figura 11.</b> Actividad enzimática de la lipoproteína lipasa (LPL) en tejido adiposo epididimal. <b>(11A)</b> Expresada como pKatal/g tejido. <b>(11B)</b> Expresada como pKatal/órgano .....	<b>60</b>
<b>Figura 12.</b> Estudio “in” vivo de la secreción de TG hepáticos en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales a las 42 semanas de ingesta. <b>(12A)</b> Acumulación plasmática de TG luego de la inyección de Triton WR-1339. <b>(12B)</b> Velocidad de secreción de TG hepáticos (VSTG) .....	<b>62</b>
<b>Figura 13.</b> Test de tolerancia grasa. Determinación de la velocidad fraccional de remoción de grasa ( $K_2$ ) en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales a las 42 semanas de ingesta .....	<b>63</b>
<b>Figura 14.</b> Relación entre los niveles de triglicéridos plasmáticos (TG).y la velocidad fraccional de remoción grasa ( $K_2$ ) en animales alimentados con las diferentes dietas a las 42 semanas de ingesta .....	<b>64</b>
<b>Figura 15.</b> Correlación entre ácidos grasos libres plasmáticos (AGNE) y glucemia a las 42 semanas de ingesta.....	<b>66</b>
<b>Figura 16.</b> Secreción de insulina en islotes pancreáticos aislados perifundidos con Glucosa 16.5 mM .....	<b>69</b>
<b>Figura 17.</b> Secreción de insulina en islotes pancreáticos aislados perifundidos con Arginina 20mM + Glucosa 5mM .....	<b>70</b>

# **RESUMEN / SUMMARY**

## **RESUMEN**

El Síndrome Plurimetabólico presenta una serie de alteraciones del metabolismo de los lípidos y los hidratos de carbono, así como también anomalías que incluyen obesidad, diabetes tipo 2 e hipertensión. Su prevalencia, extremadamente elevada en las sociedades occidentales, también ha comenzado a extenderse hacia las sociedades desarrolladas de oriente como consecuencia del fenómeno de globalización, constituyendo así un problema mundial no sólo de salud sino también socioeconómico debido a la morbilidad de las patologías asociadas al mismo. Atento a ello, el estudio de las variables susceptibles de ser modificadas (tales como la dieta y el estilo de vida) cobra fundamental importancia. Consecuentemente, en este trabajo estudiamos en un modelo experimental adecuado para este fin la posibilidad de revertir o al menos mejorar alguna de las manifestaciones bioquímicas-metabólicas de este Síndrome por manipulación dietaria.

A tal efecto se utilizó un modelo experimental de hipertrigliceridemia, intolerancia a la glucosa y resistencia insulínica estable inducido nutricionalmente en ratas normales por una ingesta crónica (30 -42 semanas) de dieta rica en sacarosa 63% p/p (DRS 63%). En estos animales se redujo el porcentaje de sacarosa (63 a 20% p/p) sustituyéndola por almidón durante las últimas 12 semanas de ingesta. Los estudios se focalizaron en diferentes aspectos del metabolismo lipídico y su relación con la homeostasis de la glucosa.

De los resultados obtenidos puede concluirse que:

1. La marcada reducción en el peso corporal, la adiposidad (masa de tejido adiposo visceral), la disponibilidad de ácidos grasos no esterificados (AGNE) plasmáticos y el contenido de grasa en la carcasa pudo obtenerse por la sustitución parcial del porcentaje de sacarosa dietaria sin necesidad de recurrir a la restricción calórica.

2. La sustitución parcial del contenido de sacarosa dietaria por almidón normaliza el contenido de triglicéridos plasmáticos (TG) y la velocidad de secreción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-TG), así como la velocidad de remoción de triglicéridos plasmáticos (K<sub>2</sub>). Ambos mecanismos contribuyen a la normotrigliceridemia.
  
3. La menor disponibilidad de AGNE plasmáticos indujo a un menor contenido lipídico en tejidos no adiposos (hígado, músculo esquelético y cardíaco) y esto posiblemente contribuye a mejorar el patrón de secreción de insulina en islotes aislados perfundidos frente a diferentes secretagogos. La homeostasis de la glucosa tiende a normalizarse sin modificaciones en la insulinemia.

Si bien nuestros resultados no pueden ser extrapolados en forma directa a lo que ocurre en humanos, consideramos que la recomendación de la reducción del consumo por parte de la población de azúcares refinados y/o la sustitución de los mismos por azúcares complejos (almidones) puede ser muy útil no sólo para ayudar en la prevención sino también para mejorar patologías asociadas al Síndrome Plurimetabólico.

## **SUMMARY**

The Plurimetabolic Syndrome is characterized by a series of alterations in the metabolism of lipids and carbohydrate as well as by obesity, type 2 diabetes and hypertension. Although it shows an extremely high prevalence in Western societies, because of globalization, it has started to spread to Eastern developed societies. Thus, it now constitutes a worldwide health and socioeconomic issue due to the morbimortality of the pathologies associated to the Syndrome. This is why the study of those variables capable of being modified, such as diet and life style acquire paramount importance. In the present work we have studied the possibility of reversing or improving some of the pathologies associated with this Syndrome by means of dietary manipulations.

An experimental model of stable hypertriglyceridemia, glucose intolerance and insulin resistance was used. Normal rats were chronically (30-42 weeks) fed a sucrose rich diet (SRD 63% w/w). In half of the rats the sucrose percentage was later reduced to 20% w/w by substituting starch for sucrose during the last 12 weeks. Studies focused on the different aspects of lipid metabolism and its relationship with glucose homeostasis.

From the results here obtained, the following conclusions can be pointed out:

1. The marked reduction in body weight, adiposity (visceral adipose tissue mass), availability of plasmatic non-esterified fatty acids (NEFA) and fat content in the rat carcass could be achieved by the partial replacement of sucrose in the diet, there being no need of caloric restriction.
2. The partial substitution of starch for dietary sucrose not only normalizes the content of plasmatic triglycerides (TG) and the rate of hepatic secretion of very low density lipoproteins (VLDL-TG), but also the rate of

removal of plasmatic triglycerides ( $K_2$ ), both mechanisms contributing to normotriglyceridemia.

3. The lower availability of plasmatic NEFA led to a lower lipid content in non-adipose tissues (liver, skeletal and cardiac muscles), which probably contributes to the improvement of the insulin secretion pattern in isolated islets perfused with different secretagogues. Glucose homeostasis tends to normalize, with no changes in insulinemia.

Although the results obtained cannot be directly extrapolated to human beings, a reduction in the consumption of refined sugars and/or their replacement by complex sugars (starches) is recommended in order to contribute not only to the prevention but also to the improvement of pathologies associated to the Plurimetabolic Syndrome.

# **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

# **INTRODUCCIÓN**

## **I. EL SÍNDROME PLURIMETABÓLICO**

Los factores nutricionales, genéticos y el estilo de vida (sedentarismo) contribuyen al desarrollo de una serie de anormalidades metabólicas muy comunes en la población general tales como: dislipidemias (incremento de los niveles de triglicéridos y/o colesterol plasmático), intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus tipo 2 (no insulino dependiente) hipertensión arterial, obesidad, etc.

El conjunto de estas dismetabolias se hallan presentes en el conocido Síndrome X o Síndrome Plurimetabólico. A fines de la década del '80, Reaven (1988) sugirió que la resistencia a la insulina asociada a hiperinsulinemia era la anomalía más común en el Síndrome X. Aunque existen controversias acerca de cuáles son los componentes que lo constituyen, la definición más ampliamente utilizada incluye: intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 2, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, obesidad central, dislipidemia e hipertensión. Todas éstas estrechamente relacionadas con la enfermedad cardiovascular (ECV) (Eschwège y Balkau, 2001). Más aún, se ha reconocido ampliamente la implicancia de la insulino-resistencia en los factores de riesgo de ECV [Adult Treatment Panel III (ATP III) Guideliness, 2004]. Otros componentes sugeridos comprenden hiperuricemia, microalbuminuria, hipercoagulación e hiperleptinemia (Síndrome Plurimetabólico, Actas del Simposio Internacional 2001).

Estudios estadísticos acerca de la prevalencia del Síndrome Plurimetabólico en la población de los EEUU han estimado que se encuentra presente en 1 de cada 4 adultos (Ford y col, 2002; Reaven G, 2002). En nuestro país patologías relacionadas al Síndrome representan un considerable problema de salud pública. Al respecto la enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en individuos mayores de 45 años. En este sentido, la American Heart Association (AHA) en su revisión del año 2006 considera a la dieta como parte de un "todo" que incluye el estilo de vida y reconoce que la mejora de ambos

aspectos es un componente crítico en la estrategia para prevenir la ECV (Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006). Además estudios recientes de la prevalencia de diabetes mellitus alcanzan en nuestro país cifras del 6-7% (Gagliardino y col., 2000). Estos datos han incrementado notablemente en los últimos años. Aún más, este hecho se observa en individuos muy jóvenes (30 años). Otro aspecto importante a valorar es el aumento de sobrepeso y obesidad, lo que ha llevado a ser considerado por numerosos países, incluido el nuestro, como un problema “endémico”.

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

## **II. MODELOS EXPERIMENTALES ANIMALES**

Los estudios realizados en humanos han permitido observar que algunos grupos son más susceptibles que otros a manifestar los trastornos metabólicos asociados al Síndrome Plurimetabólico. Es probable que factores tales como la etnia, los hábitos alimentarios, la proporción y tipo de grasa u otros constituyentes de la dieta, sumados a la susceptibilidad individual, resulten una complicada variedad de parámetros a tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos (Thorburn, 1990; Bantle, 2000; Meyer, 2000; Liu 2000). El uso de modelos animales -donde se pueden acotar algunas de las variables mencionadas- resulta sumamente útil para discernir entre los posibles mecanismos fisiopatológicos involucrados en las alteraciones metabólicas presentes en el Síndrome Plurimetabólico.

Existen numerosos modelos animales experimentales utilizados para el estudio de dislipidemia, diabetes no insulino dependiente y resistencia insulínica entre ellos podemos mencionar:

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

- **Ratas Zucker:**

Se han usado ampliamente como modelo para el estudio de obesidad. Se caracterizan por presentar obesidad genéticamente transmitida por mutación autosómica recesiva del gen *fa*, recientemente identificado en el cromosoma 5, que codifica para el receptor de la leptina. Dicho gen presenta homología con el gen *db* de ratones diabéticos. Los animales homocigotos (*fa/fa*) presentan hiperglucemia, hiperinsulinemia con resistencia insulínica, hiperfagia, intolerancia a la glucosa, hipersecreción de insulina estimulada por glucosa, disminuida secreción de glucagón, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Pueden considerarse como un modelo de diabetes tipo 2 y de dislipemia tipo IV (D. Mathé, 1995). Datos más recientes indican que los niveles de mRNA transcriptos del gen *ob* en el tejido adiposo aumentan a temprana edad (3 semanas de vida) y continúan aumentando luego con la edad, el peso corporal y la insulina sérica, reflejando un precoz desarrollo de la resistencia a la leptina y a la insulina (Igel M y col., 1996).

- **Ratas Wistar obesas:**

El gen *fa* fue transferido desde las ratas Zucker a las ratas Wistar Kyoto (WKY), desarrollando un modelo de ratas Wistar obesas (*fa/fa*). Del mismo modo que las Zucker se hallan presentes la obesidad y los trastornos relacionados, tales como hiperinsulinemia e hiperlipemia. Los machos desarrollan hiperglucemia, glucosuria y poliuria a edades tempranas con posterior aparición de hipertensión arterial. La tolerancia oral a la glucosa y la respuesta insulínica también disminuyen con la edad. Los cambios observados en los animales diabéticos parecen ser causados por una interacción entre la predisposición a desarrollar diabetes en las WKY y la obesidad inducida por el gen *fa*. (Ikeda y col., 1981; Yamakawa y col., 1995).

- **Ratas JCR LA cp:**

Este modelo de rata seleccionada genéticamente posee el gen *cp* (denominado comúnmente “corpulento”), autosómico recesivo. El modelo posee una característica que lo hace único entre las cepas obesas, ya que los machos homocigotos desarrollan espontáneamente lesiones cardiovasculares. En líneas generales, al igual que las Zucker, los homocigotos presentan obesidad, hiperlipemia, e insulino-resistencia, mientras que los heterocigotos son delgados y normolipémicos (D. Mathé, 1995). Se ha sugerido que este modelo resulta interesante para el estudio de aterosclerosis, ya que las lesiones se presentan tanto en los homocigotos como en los heterocigotos, aunque son más frecuentes y severas en los primeros (Russell y col., 1986).

- **Ratones db/db:**

Presentan una mutación puntual autosómica recesiva del gen que codifica para el receptor de la leptina denominada *db*. La expresión de la obesidad y la diabetes inducida por la mutación varía según las cepas. Estos ratones son leptino-resistentes (Zhang y col, 1994). Cuando la mutación se encuentra presente en forma homocigota, los animales desarrollan hiperglucemia moderada. En ratones de la cepa C57BL/Ks, la expresión es más pronunciada, presentando obesidad, resistencia insulínica y severa hiperglucemia, con una importante disfunción en los islotes pancreáticos (Kaku y col. 1989). Comparados con controles no diabéticos, los ratones de esta cepa muestran una actividad LPL disminuída, con un aumento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Kobayashi y col, 2000).

- **Ratones ob/ob:**

La simple mutación de un gen (*ob*) que codifica la leptina, genera una proteína inactiva. En la cepa C57BL/6J provee un modelo característico de hiperfagia acompañada de obesidad, diabetes (hiperinsulinemia y moderada hiperglucemia), anormalidades metabólicas, endócrinas e inmunológicas. La obesidad es causada por la deficiencia que presenta

el producto del gen *ob*, y puede ser corregida por administración del péptido. Los niveles de mRNA que codifican la información del gen *ob* son 20 veces más elevados que en los controles delgados, indicando que la falta de una leptina activa produce una contrarregulación incrementando la expresión génica. (Igel y col, 1996; Unger y col. 1997).

## **2. Modelos experimentales de resistencia insulínica, dislipidemia y anormal homeostasis a la glucosa o diabetes tipo 2 por manipulación nutricional.**

- **Ratas del desierto (*Psammomys obesus*):**

Son normoglucémicas y normoinsulinémicas, desarrollando un peso corporal normal cuando se alimentan con su dieta vegetariana natural, originaria de África del Norte y Medio Oriente. Sin embargo, cuando consumen dieta estandar de laboratorio se vuelven obesas, desarrollan hiperglucemia, hiperinsulinemia y resistencia insulínica. El número de receptores de la insulina está marcadamente disminuído. La hiperlipidemia resulta de una incrementada producción de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y de un disminuído clearance lipídico. Es un modelo de de insulino-resistencia y diabetes tipo 2, en el cual la exigencia en la secreción de la célula  $\beta$  conduce a la degranulación y apoptosis. Cuando se someten a dietas especialmente suplementadas (por ejemplo con colesterol), pueden desarrollar lesiones cardiovasculares, constituyendo un interesante modelo de diabetes asociada a aterosclerosis sensible al tratamiento dietario y por drogas (D. Mathé, 1995; Shafrir y col, 1999).

- **Dietas ricas en grasas (DRG):** (presencia de obesidad)

En la rata normal, una dieta rica en lípidos saturados (más de 60% de la energía total) puede inducir resistencia insulínica en tejidos blanco a la acción de la insulina (hígado, músculo esquelético y tejido adiposo)

asociada a dislipemia, anormal homeostasis a la glucosa y obesidad (Storlien y col, 1993 y 1986; Kraegen y col, 1986; Oakes y col, 1997b). Se han señalado defectos en la señal de insulina en tejidos periféricos cuando se administra esta dieta a animales de experimentación. En tejido adiposo la dieta grasa disminuye la masa proteica del sustrato receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1, IRS-2), además de la expresión génica (mRNA) del transportador de glucosa GLUT4 (Pedersen y col, 1991) (Sevilla y col, 1997). En músculo esquelético disminuyen tanto las vías oxidativas como no oxidativas de la glucosa mientras que aumentan el contenido de triglicéridos, acil-CoA de cadena larga y diacilglicerol (DAG) (Oakes y col, 1997a; Kraegen y Cooney, 1999; Schmit-Peiffer y col, 1997), alterando las primeras secuencias de la señal insulínica las cuales involucran la fosforilación de la tirosina del IRS-1 como también de la actividad del la PI3K (Bell y col, 2000; Taouis y col, 2002). También se observa resistencia insulínica hepática (falla en la supresión de la producción hepática de glucosa y consecuente aumento de gluconeogénesis) (Commenford y col. 2002).

Las dietas grasas aumentan la concentración plasmática y la expresión del gen de la leptina en tejido adiposo (Masuzaki y col, 1995; Rousseau y col, 1997) de animales de experimentación que reciben esta dieta. Este aumento, sin embargo, no previene la hiperfagia y la obesidad, sugiriendo que estos animales desarrollan resistencia a la leptina (Aninil y Brubaker, 2003; Naggert y col, 1995). Por otro lado, los niveles plasmáticos de adiponectina disminuyen cuando existe aumento de la masa adiposa (Arita y col, 1999).

- **Dietas ricas en sacarosa:** (presencia de adiposidad visceral)

Numerosas investigaciones incluyendo las de nuestro grupo (Lombardo y col, 1983 y 1996; Pagliassotti y col, 1996 y 2002; Reaven y col, 1979 y 1984; Vrana y Fabry, 1983) demostraron que ratas normales alimentadas con dietas ricas en carbohidratos (fructosa o sacarosa) por un período de tiempo desarrollan hipertrigliceridemia, elevados niveles de AGNE, incremento del contenido de TG hepáticos y en tejidos periféricos

(músculo esquelético y cardíaco), hiperinsulinemia, resistencia insulínica en tejidos blanco (hígado, músculo esquelético y tejido adiposo), moderada adiposidad e hipertensión. Muchas de estas anormalidades metabólicas se encuentran también presentes en el Síndrome metabólico en el humano (Zakim y col, 1969; Parks E., 2001; Schulze y col, 2004; Landry y col, 2003).

Dada la importancia de este modelo nutricional para el estudio del S. Plurimetabólico ha sido utilizado para el desarrollo de esta Tesis. De lo expuesto, un detalle más preciso del modelo se desarrollará a continuación.

### **III- LA DIETA RICA EN SACAROSA**

#### **1. GENERALIDADES DEL METABOLISMO DE LA FRUCTOSA**

La D-Fructosa está presente en los alimentos ya sea como azúcar simple (monosacárido) o formando parte del disacárido sacarosa, compuesto que posee una molécula de glucosa y una de fructosa. Los procesos digestivos y absorbivos de los dos monosacáridos son diferentes.

Cuando la sacarosa es clivada por la disacaridasa (sacarasa), la glucosa se absorbe por cotransporte asociado al  $\text{Na}^+$ , utilizando como transportador al SGLT1 (intestinal sodium dependent D-glucose co-transporter protein) mientras que la fructosa lo hace por difusión facilitada sin gasto energético utilizando como transportador al GLUT 5 (small intestine facilitative glucose transporter).

En humanos dietas conteniendo elevadas cantidades de sucrosa (60% de la energía) incrementan la actividad de la sacarasa y la capacidad de absorción de la fructosa proveniente de la sacarosa excede la capacidad del monosacárido como un nutriente aislado (Bizeau y col, 2005).

Luego de la absorción, glucosa y fructosa se dirigen por circulación portal al hígado. Este órgano resulta el sitio principal de extracción y metabolización de la fructosa dando cuenta de un 50-70% de la fructosa disponible, mientras que para la glucosa representa un 20-30% de la glucosa absorbida (Bizeau y col, 2005). En humanos y en la rata tanto la mucosa del intestino delgado como el riñón también contienen las enzimas necesarias para el catabolismo de la fructosa. Sin embargo, la utilización de fructosa en tejidos periféricos es mínima (Hallfrish, 1990).

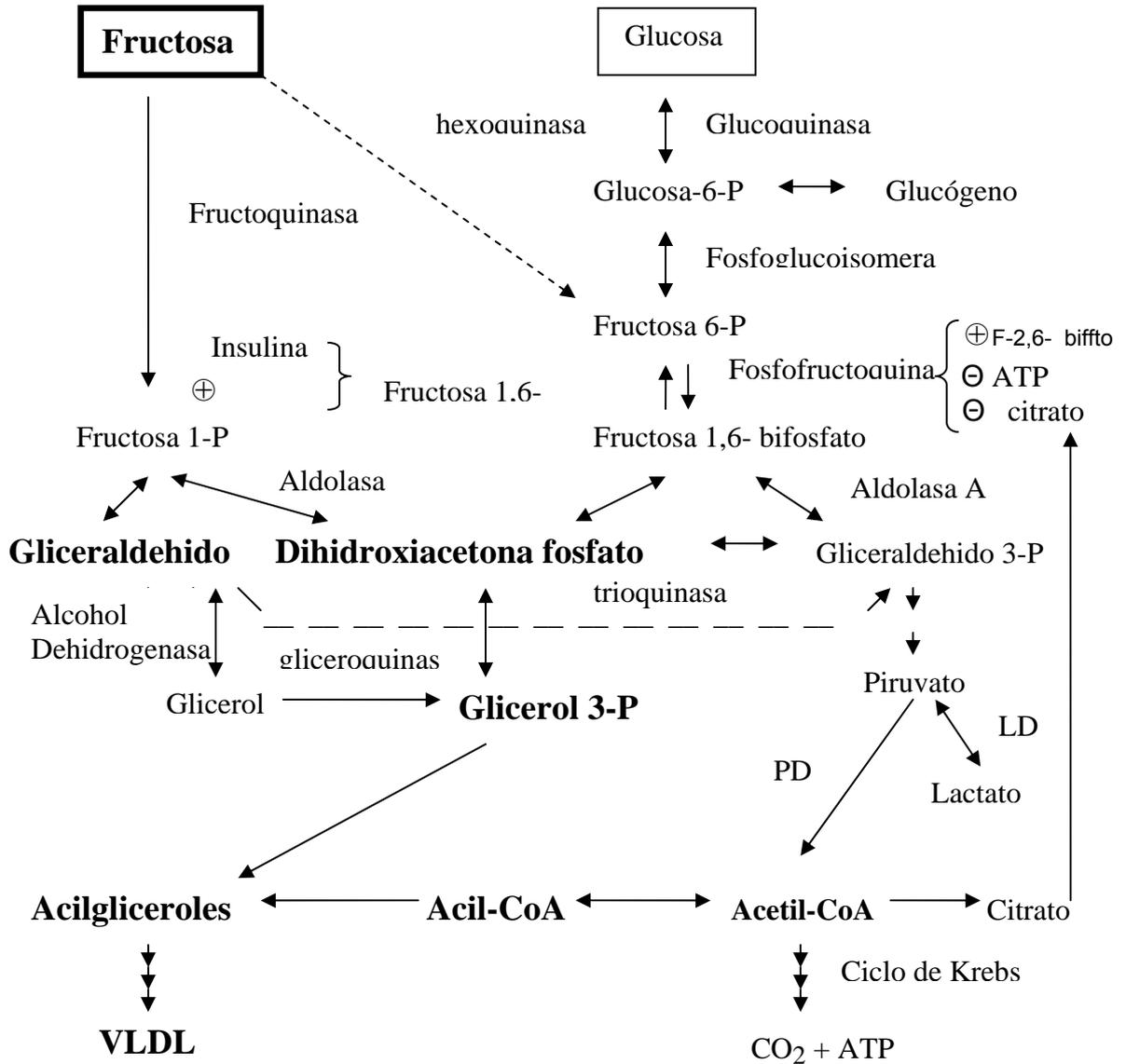
La metabolización hepática de la glucosa y de la fructosa difieren sustancialmente como puede observarse en la **Fig. 1**. El metabolismo hepático de la fructosa comienza a partir de la fosforilación (con adenosina trifosfato) para formar fructosa-1-fosfato, reacción catalizada por la enzima fructoquinasa (EC 2.7.1.4). Incrementos en la cantidad de fructosa en la dieta de ratas y humanos induce incrementos en la actividad de la fructoquinasa (Hallfrish, 1990). La fructosa 1-fosfato es escindida por la aldolasa B (EC 4.1.2.13) en gliceraldehido y dihidroxiacetona fosfato. La actividad de esta enzima resulta incrementada por aumento de la fructosa dietaria en humanos y ratas (Hallfrish, 1990).

Las dos triosas formadas por el clivaje de la fructosa 1-fosfato pueden seguir las siguientes vías:

**A) Dihidroxiacetona fosfato** continuando la vía glicolítica puede 1) ser isomerizada a gliceraldehido fosfato y continuar hacia la vía glucolítica dando piruvato, el cual se convierte en lactato (en condiciones anaeróbicas) o entra en el ciclo del ácido cítrico como acetil-CoA (bajo condiciones aeróbicas). El acetil-CoA puede a su vez producir energía vía cadena respiratoria o ser usado como sustrato en la síntesis de ácidos grasos; 2) reducirse a glicerol-3-fosfato y proveer el esqueleto glicerol para la síntesis de triglicéridos, fosfolípidos y otros lípidos.

Otro aspecto a considerar a partir del gliceraldehido-3-fosfato es la vía neoglucogénica con formación de fructosa-1,6-difosfato para dar finalmente glucosa o glucógeno (Hallfrish, 1990).

**Figura 1. Metabolismo hepático de la fructosa y la glucosa**



La fructosa es fosforilada y luego convertida en triosa-fosfato que sirve como esqueleto para la síntesis de triglicéridos. En contraste la glucosa depende para la progresión en la vía glucolítica de la actividad de la fosfofructoquinasa, una enzima altamente regulada. Puesto que la fructosa evita esta etapa limitante, un elevado flujo de la misma promueve la síntesis de TG y la producción de VLDL.

**B) Gliceraldehido** puede 1) fosforilarse por acción de la triosa-quinasa. Esta enzima presente en hígado de rata aumenta en animales alimentados con fructosa (Hallfrish, 1990). EL gliceraldehido fosforilado puede continuar hacia la glucólisis, ser utilizado para la gluconeogénesis o almacenarse como glucógeno; 2) reducirse a glicerol por acción de una alcohol dehidrogenasa. El glicerol a su vez puede fosforilarse a glicerol-3-fosfato; 3) convertirse en glicerato por acción de una dehidrogenasa y luego entrar a la vía glucolítica.

Así, la molécula de fructosa es convertida en 2 moléculas de triosa fosfato que evitan el principal punto de control de la glucólisis (la fosfofructoquinasa, EC 2.7.1.11). A este nivel el metabolismo de la glucosa está limitado por la regulación inhibitoria del citrato y del ATP. Más recientemente se ha descubierto una forma de la fructosa –fructosa 2,6 bifosfato- que serviría como un importante regulador positivo del metabolismo de los carbohidratos en el hígado. Su síntesis y degradación es catalizada por un único complejo (6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa) cuyo control se produce por fosforilación y desfosforilación según las necesidades energéticas. El nivel de la fructosa 2,6-bifosfato afecta el nivel de dos enzimas importantes en la regulación del metabolismo de los carbohidratos en el hígado: fosfofructoquinasa 1 y fructosa 1,6 difosfatasa (Hallfrish, 1990).

## **2- EFECTO DE LA FRUCTOSA EN EL HOMBRE**

La fructosa presente en la dieta parece jugar un rol importante en el metabolismo de la glucosa.

**Reducidas cantidades de fructosa** pueden incrementar la captación hepática de glucosa a partir de un efecto estimulador sobre la glucoquinasa - vía proteína regulatoria de la glucoquinasa-, incrementar el flujo hacia la glucógeno sintetasa y estimular la síntesis de glucógeno (Bizeau y col, 2005).

En el hombre la respuesta glucémica e insulinémica post-prandial difiere sustancialmente cuando se ingieren almidones (o aún glucosa misma) en

relación a la sacarosa/fructosa, mostrando niveles más bajos para estos últimos durante las 2-3 hs posteriores a la ingesta (Daly, 2003). En relación a los mecanismos implicados en esta respuesta diferente se postula que la glucosa, además de su acción per se sobre la liberación de insulina pancreática, es capaz de estimular la liberación de dos péptidos intestinales (polipéptido insulinoatrófico y péptido similar al glucagón GLP1) con acción sobre la secreción insulínica. La fructosa, en cambio, es incapaz de estimular la secreción de insulina pancreática, probablemente a causa de la falta de su transportador GLUT-5 (Bray y col, 2004).

En el diabético tipo 2 se sugirió que la fructosa podría restablecer la disminución de la respuesta glucémica y una mejor tolerancia luego de una sobrecarga de glucosa, sin presentar cambios en la respuesta insulínica ni en los niveles plasmáticos de AGL y triglicéridos. De este modo, la evidencia de que la fructosa tiene una menor influencia que la glucosa sobre los niveles plasmáticos de insulina y la glucemia dieron lugar a la consideración este monosacárido como un tratamiento positivo para el control de la diabetes. Sin embargo investigaciones al respecto alertaron rápidamente sobre otros efectos “desfavorables” de este azúcar sobre el incremento de peso corporal, la obesidad y la resistencia insulínica lo cual hace que actualmente no sea considerado un sustituto adecuado de la glucosa en estos pacientes (Basciano y col, 2005).

Contrariamente, **cuando las dosis de fructosa consumidas son más elevadas** muchas de las cuestiones acerca de los efectos positivos y negativos de la fructosa pueden ser resueltas examinando las vías metabólicas. De este modo los efectos benéficos no continúan con la utilización crónica puesto que, como se menciona en el apartado anterior, la entrada de fructosa es capaz de proveer carbonos tanto para glicerol como para los grupos acilos necesarios en la síntesis de triglicéridos, evadiendo las vías de control metabólico que pueden existir frente a una ingesta de glucosa. De esta manera, la fructosa resulta más lipogénica que la glucosa. Este efecto es aún más exacerbado en condiciones preexistentes de hiperlipemia, resistencia insulínica y diabetes tipo 2 (Elliot y cols, 2002).

Se ha determinado también que existe una asociación entre la sensación de saciedad producida por los alimentos y el índice glucémico (IG) de los mismos. El IG es utilizado comúnmente como elemento comparativo entre varios nutrientes e indica cómo los distintos alimentos varían los niveles de glucemia plasmáticos luego de su ingestión. Existe una relación inversa entre IG y el apetito con consecuente incremento de la ingesta calórica (Basciano y col, 2005). Esto fue observado en individuos jóvenes con dietas ricas en sacarosa (Anderson y col, 2002). Más aún es importante tener en cuenta que la ingesta diaria de azúcares refinados, fundamentalmente jarabes de alta fructosa, se han ido incrementando en forma continua desde los últimos 20 años fundamentalmente en niños y adolescentes, lo cual parece cobrar un rol muy importante en el desarrollo de la obesidad (Johnson y col, 2001). Estudios realizados en USA muestran que un importante número de individuos aparentemente saludables obtiene más del 30% de la energía total de sus dietas a partir de azúcares tales como sacarosa y fructosa. Un problema similar ha sido observado en diferentes países latinoamericanos incluidos el nuestro. (Bray y col, 2004; Elliot y col, 2002; Saris, 2003; Malik y col, 2006; Ismail y col, 1997).

### **3- EFECTO DE LA DIETA RICA EN SACAROSA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Como se mencionó anteriormente (item II- 1.2, pág. 14) diferentes trabajos incluyendo los de nuestro grupo (Reaven, 1984; Vrāna y Kazdova, 1983; Pagliassotti y col, 1996; Lombardo y col, 1983; Gutman y col, 1985; Chicco y col, 1990; Bernal y col, 1995) demostraron que ratas adultas jóvenes normales alimentadas por un corto período de tiempo (3-5 semanas) con una dieta rica en sacarosa (DRS) desarrollan dislipidemia (elevados niveles de AGNE y triglicéridos plasmáticos), incremento de triglicéridos hepáticos y mayor secreción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Las dietas ricas en sacarosa incrementan la lipogénesis hepática. Miyazaki y col, (2004) observaron en ratones alimentados con 60% de fructosa durante 7 días una inducción de la expresión génica de las enzimas Ácido Graso Sintetasa (FAS),

Acil-CoA carboxilasa y la esteoil-CoA desaturasa (SCD) -todas involucradas en la lipogénesis- consecuente con una inducción de la isoforma SREPB1. Anormal homeostasis a la glucosa, hiperinsulinemia, en ausencia de obesidad y resistencia insulínica periférica global también fue constatado en los animales alimentados con DRS (Thorburn y col, 1989; Storlien y col, 1988 y 1993; Young y col, 1988; Pagliassotti y col, 1996). Pagliassotti y col (2002) demostraron que el desarrollo de la resistencia insulínica periférica y hepática podría deberse a alteraciones a nivel postreceptor de la señal de insulina, involucrando una disminución de la fosforilación del residuo de tirosina del IRS y de la actividad de la PI3K.

En relación al músculo esquelético, tejido clave en la acción insulínica, los elevados niveles de ácidos grasos plasmáticos conducen a un incremento de acil-CoA (Chicco y col, 2003) y DAG (Chunli y col, 2002). Esto se asocia con una activación de la PKC  $\theta$  y una reducción de la fosforilación de la tirosina del IRS-1 y de la masa de la IRS-1 asociado con la actividad PI3K, alterando el transporte de la glucosa bajo el estímulo de la insulina (Chunli y col, 2002).

Una excesiva disponibilidad de lípidos podría ejercer en el músculo cardíaco un efecto deletéreo en la utilización del combustible energético (glucosa-AGNE). Al respecto Lombardo y col (1983) demostraron un incremento en el contenido de triglicéridos en el corazón de la rata alimentada con DRS asociado a niveles elevados de AGNE y a insensibilidad insulínica. Más aún Chicco y col (1986) observaron una alterada actividad del complejo piruvato dehidrogenasa (PDHc) enzima clave en la vía oxidativa de la glucosa.

Respecto al tejido adiposo, su masa puede cambiar bajo distintas condiciones que incluyen edad, estado metabólico y balance energético (Hausberger, 1967; Schling y Löffler, 2002). En relación a esto, Soria y col (2001) demostraron cambios metabólicos en adipocitos aislados de ratas alimentadas con DRS por un período corto de tiempo, con aumento de la lipólisis basal y disminución de la acción antilipolítica de la insulina sin alteraciones del tamaño celular o de la masa de tejido adiposo epididimal. Además Peyron-Caso y col (2002) observaron una disminución en la actividad, masa proteica y mRNA del transportador GLUT4 en tejido adiposo epididimal de animales alimentados con DRS durante 3 semanas.

### **Efecto de la dieta rica en sacarosa administrada por un período prolongado de tiempo.**

La magnitud de los cambios endócrinos inducidos por la ingesta de una DRS depende de la cronicidad de la dieta. Numerosos estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio (Gutman y col., 1987; Lombardo y col., 1996; Chicco y col., 2003) mostraron que en presencia de dislipemia, los niveles plasmáticos de glucosa e insulina evolucionan desde normoglucemia e hiperinsulinemia luego de 3-5 semanas de dieta a moderada hiperglucemia y normoinsulinemia luego de 15 semanas. Más aún cuando el período de alimentación se extiende a 40 semanas se observa un estado estacionario de hipertrigliceridemia e incrementados niveles de AGNE plasmáticos que se acompaña de hiperglucemia, resistencia insulínica periférica global más deteriorada, sin cambios en los niveles de insulina.

El músculo cardíaco no es ajeno a los cambios del medio metabólico hormonal. En un trabajo reciente (D'Alessandro y col, 2007) se pudo constatar que la lipotoxicidad (incremento en el contenido de TG, acil-CoA de cadena larga y diacilglicerol) presente en este tejido se acompaña de un significativo decrecimiento del metabolismo oxidativo y no oxidativo de la glucosa. Más aún un incremento de la masa proteica de la isoenzima nPKC $\epsilon$  en la fracción de membrana del miocardio sugiere la presencia de hipertrofia y disfunción del músculo cardíaco.

En este período de ingesta los animales alimentados con DRS presentan un ligero incremento de peso y una manifiesta adiposidad visceral (Soria y col, 2002; Rossi y col, 2005). Además los niveles plasmáticos de leptina y adiponectina se encuentran significativamente disminuidos (Rossi y col, 2005).

El páncreas endócrino mostró un significativo incremento del número y área de las células  $\beta$  así como del perfil de distribución de las células de los islotes sin cambio en el contenido pancreático de insulina (Lombardo y col 1996) (Chicco y col., 2003; Del Zotto y col, 2002 y 2004). Además el patrón bifásico de secreción de insulina bajo el estímulo de glucosa en islotes aislados perifundidos muestra un progresivo deterioro durante todo el período en que la dieta es consumida. De esta manera podemos constatar una ausencia del primer pico y un incremento de la segunda fase de secreción de la hormona en el período comprendido entre 30 y 40 semanas de ingesta. Los cambios

temporales metabólicos previamente descritos reflejarían las etapas tempranas de la diabetes mellitus tipo 2, ya que en numerosos pacientes se observa un incremento sostenido de AGNE y TG plasmáticos con una sensibilidad insulínica periférica alterada y una pérdida del primer pico de secreción de insulina por la glucosa.

Por otro lado aspectos fisiológico- metabólicos parciales de la administración prolongada de una dieta rica en sacarosa fueron también observados por otros autores. Al respecto Boot-Handford y Heat (1981) demostraron que la alimentación de ratas Wistar normales con una dieta rica en sacarosa (68% p/p) durante 6 meses produjo glomeruloesclerosis y aumento en el peso renal. Cohen y col. (1977, 1978) observaron alimentando ratas genéticamente seleccionadas con dieta rica en fructosa o sacarosa (72 % p/p) durante 8 meses un incremento de los niveles de TG y colesterol plasmáticos y una disminución de la tolerancia a la glucosa con insulino-resistencia. Por su parte Hallfrish y col. (1979) administrando dietas moderadamente ricas en fructosa (15% a 20% p/p) durante tiempos prolongados (3 a 9 meses) demostraron una disminuída tolerancia a la glucosa e incrementada respuesta insulínica en pruebas de tolerancia oral a la glucosa. Además, la administración de esta dieta a ratas Wistar durante 9 meses produjo un incremento en las actividades de las enzimas lipogénicas del hígado y del tejido adiposo epididimal, mientras que los niveles de TG y colesterol plasmático permanecieron invariables.

## **OBJETIVOS**

De lo expuesto, los animales alimentados durante un período prolongado con una DRS constituyen un modelo experimental apropiado para analizar distintos aspectos fisiológicos-metabólicos, así como también el efecto de cambios en el porcentaje o composición de los nutrientes que pudieran conducir a corregir o mejorar estas anomalías.

La mayor parte de los estudios experimentales que examinan la relación entre la dieta y la resistencia insulínica han sido enfocados en el desarrollo de esta anomalía. A modo de ejemplo, Huang y col (1997) y Podolin y col (1998) utilizaron un cambio parcial en la composición de grasa dietaria de la DRS por aceite de pescado rico en n-3 polinosaturados (PUFA) en estudios de prevención a corto plazo. Sin embargo relativamente pocos estudios han examinado la eficacia de los nutrientes de la dieta en revertir la resistencia insulínica (Lombardo y col, 1996; Soria y col, 2002; Podolin y col, 1998). Al respecto, una posibilidad fue examinar el efecto de los PUFA en ratas en las que se ha administrado una DRS por un período largo de tiempo (mayor a 15 semanas) en lugar de un período corto de tiempo (3-4 semanas). Más aún, como ya mencionáramos, nuestro grupo ha demostrado que el milieu metabólico-hormonal cambia y se deteriora con el transcurso del tiempo durante el cual la dieta es administrada (Gutman y col, 1987).

Otro aspecto interesante pero poco analizado se refiere al cambio del tipo de carbohidrato dietario. En esta línea Cohen y col. (1964) observaron que la intolerancia a la glucosa inducida en ratas alimentadas durante 11 semanas con DRS 67% (p/p) pudo revertirse cuando la fuente de hidrato de carbono de la dieta (sacarosa) fue reemplazada completamente por almidón por un período de 3 semanas. Sin embargo, cuando estos animales volvieron a alimentarse con la DRS, se restableció la intolerancia a la glucosa en sólo 10 días.

Dentro de este contexto y de todo lo expuesto anteriormente **el objetivo general** de la presente tesis es: testar si la reducción del alto contenido de

azúcar refinado de la dieta (63% p/p) a niveles semejantes a los consumidos actualmente por el hombre (aproximadamente 20%) en presencia de dislipemia e insulino-resistencia crónica, puede contribuir a mejorar o revertir las alteraciones antes mencionadas.

De acuerdo al objetivo general propuesto, a las consideraciones antes expuestas y los fundamentos sobre la importancia del tema a analizar los **objetivos específicos** fueron:

- 1) Determinar en forma secuencial el tiempo al cual es posible producir cambios significativos en la dislipemia e insensibilidad insulínica reemplazando el porcentaje de sacarosa (63% por 20%) a partir de las 30 semanas de ingesta (período de dislipemia y resistencia insulínica estable). En particular se analizarán:
  - A. Modificaciones del peso corporal, la grasa visceral y la ingesta calórica.
  - B. Niveles de TG, AGNE, Glucosa e Insulina plasmáticos. Contenido de TG hepáticos y musculares (esquelético y cardíaco).
  
- 2) Una vez determinado el tiempo más adecuado capaz de lograr las mayores modificaciones de los parámetros mencionados en el ítem 1, se analizarán los siguientes aspectos bioquímicos-metabólicos:
  - A. Composición de la carcasa y actividad LPL del tejido adiposo epididimal.
  - B. Mecanismos involucrados en la hipertrigliceridemia. Estudios “in vivo” : secreción hepática de VLDL-TG y remoción plasmática de TG.
  - C. Mecanismos relacionados con la homeostasis de la glucosa y secreción insulínica:
    - a) Contenido de glucógeno y actividad glucógeno sintasa en el músculo esquelético.
    - b) “in vitro” secreción de insulina en islotes pancreáticos aislados perifundidos frente a estímulo de diferentes secretagogos (Glucosa , Glucosa + Arginina)

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## I. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y TRATAMIENTOS DIETARIOS

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar C.F. con un peso inicial de 180-200g provenientes de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA, Buenos Aires, Argentina). Desde su llegada y durante toda la experiencia los animales se mantuvieron en bioterio estandarizado y bajo condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), humedad y ciclo de luz/ oscuridad (7:00 – 19:00 hs).

Durante la semana siguiente a su arribo (período de aclimatación) los animales fueron alimentados “ad libitum” con una dieta común de laboratorio (pellet) y agua. Al cabo de este período las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos: el **grupo experimental** recibió una dieta semisintética rica en sacarosa (DRS 63% p/p), mientras que el **grupo control** recibió la misma dieta en la cual la sacarosa se reemplazó isocalóricamente por almidón (DC). En la **Tabla 1** puede observarse la composición de las dietas basada en las recomendaciones del Comité ad hoc del “American Institute of Nutrition” (Reeves y col., 1993). Las mismas fueron preparadas semanalmente y mantenidas a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del consumo. Todas proveen aproximadamente 16.05 kJ/g de comida seca.

Al finalizar las 30 semanas de dieta el grupo DRS se dividió aleatoriamente en dos subgrupos: un subgrupo continuó con la dieta rica en sacarosa 63% p/p hasta el final de la experiencia (42 semanas), en el otro subgrupo se sustituyó la sacarosa 63% por sacarosa 20% + almidón 43% (DRS 20%). Los animales del grupo control continuaron con la DC hasta alcanzar las 42 semanas de ingesta (**Fig.2**).

Los animales se pesaron individualmente al menos dos veces por semana durante todo el período experimental. En un experimento en paralelo se estimó la ganancia de peso e ingesta calórica utilizando 6 a 8 animales en cada uno de los lotes (DC, DRS 63% o DRS 20%).

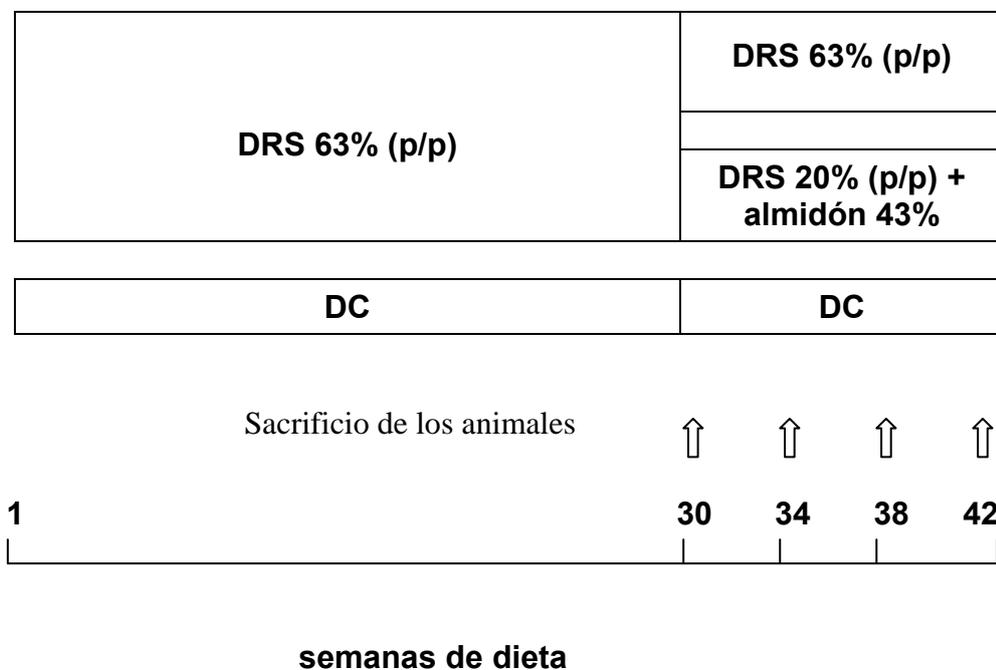
**Tabla 1. Composición de las dietas experimentales expresada como g/100g de dieta en base seca (p/p) y como porcentaje de las calorías totales (%E).**

Componentes	DC		DRS 63%		DRS 20%	
	(p/p)	%E	(p/p)	%E	(p/p)	%E
Almidón	63	65.8	-	-	43	44.9
Sacarosa	-	-	63	65.8	20	20.9
Caseína	17	16.4	17	16.4	17	16,4
Aceite de maíz	7	17.8	7	17.8	7	17.8
Vitaminas <sup>1</sup>	1	-	1	-	1	-
Fibra (celulosa)	8	-	8	-	8	-
Sales (AIN-93M-MX) <sup>2</sup>	3.5	-	3.5	-	3.5	-
Colina (bitartrato)	0.2	-	0.2	-	0.2	-
Metionina	0.3	-	0.3	-	0.3	-

1-Mezcla de vitaminas AIN-93M-VX (g/kg de dieta): Vitamina A (500.000 UI/g) 0,8; vitamina D<sub>3</sub> (400.000 UI/g) 2,75; vitamina E (500 UI/g) 15.0; vitamina K, 0,075; biotina, 0.020; vitamina B12, 2500; ácido fólico 0,200; niacina 3,0; pantotenato de calcio 1,6; piridoxina HCl 0,7; rivotravina 0,6; tiamina HCl 0,6.

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

**Figura 2. Diseño experimental**



En relación al primer objetivo planteado en la Tesis, en una primera etapa se realizó un estudio a diferentes tiempos -posteriores a la disminución del porcentaje de sacarosa (DRS 20%)- a fin de identificar aquel al cual se producen los cambios más significativos en la dislipemia e insensibilidad insulínica.

Siguiendo el objetivo planteado se sacrificó un grupo de animales alimentados con DRS 63% a las 30 semanas a fin de corroborar los datos obtenidos en trabajos previos de nuestro grupo. Posteriormente los animales de los tres grupos dietarios fueron sacrificados en forma secuencial a las 34, 38 y 42 semanas de dieta (4, 8 y 12 semanas respectivamente luego del cambio de dieta).

## **II. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE Y TEJIDOS**

Finalizado el período experimental de ingesta los animales fueron pesados y anestesiados intraperitonealmente con pentobarbital sódico (60 mg/ kg de peso corporal) y las experiencias se llevaron a cabo entre las 8.00 y las 10.00 hs a excepción de experiencias específicas que se describirán posteriormente.

Las muestras de sangre extraídas de la vena cava inferior, se colocaron en tubos de centrifuga fríos (con o sin anticoagulante apropiado de acuerdo al ensayo) y se centrifugaron a 4°C. El suero o plasma obtenido se utilizó en el momento o se conservó a -20°C hasta su procesamiento (en un período no mayor a 1 semana) para cuantificar los niveles de triglicéridos (TG), ácidos grasos no esterificados (AGNE), glucosa e insulina.

Las muestras de tejidos: hígado, tejido adiposo epididimal y retroperitoneal, músculo esquelético y cardíaco fueron obtenidas inmediatamente después de la extracción de sangre y congeladas a la temperatura de nieve carbónica utilizando una pinza de Wollemberger (Wollemberger y col, 1960) previamente enfriada a dicha temperatura y pesadas. Los tejidos congelados fueron luego pulverizados en un mortero con nieve carbónica y transferidos a tubos

crioscópicos donde se conservaron a la temperatura de N<sub>2</sub> líquido hasta su procesamiento.

### **III. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

#### **1.1- Determinaciones séricas**

##### **1.1.1- Triglicéridos**

La determinación de triglicéridos plasmáticos (TG) se realizó según la técnica descrita por Laurell (1966). Brevemente, los lípidos se extraen utilizando como solvente no polar una mezcla de éter isopropílico / etanol (95:5 v/v) al tiempo que se precipitan los fosfolípidos con ácido silícico. Los triglicéridos contenidos en el solvente no polar son sometidos a hidrólisis alcalina con una mezcla de OHK/ etanol (0.5 / 9.5 v/v). El glicerol liberado se recoge por adición de una solución acuosa – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.6 N – eliminándose los ácidos grasos liberados por aspiración de la capa orgánica. Finalmente el glicerol liberado se oxida a formaldehído al reaccionar con ácido peryódico. El exceso de este último se elimina con arsenito de sodio. El formaldehído reacciona con el ácido cromotrópico en medio sulfúrico y en caliente para dar un cromóforo violeta cuya intensidad se mide a 570 nm. Se utilizó como estándar trioleína (Sigma, 99% pureza). Los resultados se expresaron como mmol/L (mM).

##### **1.1.2- Ácidos grasos libres (AGNE)**

Los ácidos grasos no esterificados séricos se determinaron por el método espectrofotométrico enzimático que emplea acilCoA sintetasa en presencia de ATP, cationes Mg y CoA para transformarlos, en una primera etapa, en acilCoA. En una segunda etapa, éste es oxidado por la acilCoA oxidasa con producción de peróxido de hidrógeno. El mismo, en presencia de peroxidasa, permite la formación de un producto de condensación oxidativa con un máximo

de absorción a 550 nm cuya intensidad de color resulta proporcional a la cantidad de AGNE presentes en la muestra. Se utilizó para esta determinación el kit enzimático WACO NEFA-C (WaKo Chemicals USA Inc., Richmond, Virginia, USA). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol/L}$  ( $\mu\text{M}$ ).

### **1.1.3- Glucosa**

La determinación de glucosa plasmática se realizó por el método espectrofotométrico basado en el sistema enzimático que emplea glucosa oxidasa – peroxidasa de acuerdo a Bergmeyer (1974). Los resultados se expresaron como  $\text{mmol/L}$  ( $\text{mM}$ ).

### **1.1.4- Insulina**

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

## **1.2- Determinaciones en tejidos**

### **1.2.1- Determinación de Triglicéridos en tejidos hepático y musculares.**

Alícuotas de tejidos diluidas convenientemente (1/10) con solución fisiológica, fueron homogeneizadas a alta velocidad utilizando un homogeneizador con vástago de teflón previamente enfriado y mantenido entre 0 y  $4^{\circ}\text{C}$ . Volúmenes adecuados de dichos homogeneizados (0.1 ml) fueron utilizados para la

determinación del contenido de triglicéridos de acuerdo a la técnica de Laurell (1966) anteriormente descrita. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{moles/g}$  de tejido húmedo ( $\mu\text{mol/g TH}$ ).

## **2- ESTUDIOS BIOQUÍMICO-METABÓLICOS**

#

### **2.1- Análisis de la composición de la carcasa**

Seis ratas de cada grupo dietario, anestesiadas con pentobarbital, como se describió anteriormente, fueron rasuradas completamente. Luego se les practicó una incisión abdominal y se procedió a la remoción de las vísceras. Las carcasas de cada uno de los animales fueron pesadas, colocadas en recipientes plásticos y congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente fueron trituradas a la temperatura de nitrógeno líquido hasta obtener una mezcla homogénea. Salvo indicación contraria, la determinación de la composición se efectuó por duplicado en alícuotas de las mismas almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.1.1- Determinación del contenido de agua.**

La determinación de agua se efectuó en forma inmediata luego de la trituración de las carcasas. Para ello se deshidrataron alícuotas de aproximadamente 10g en una estufa de secado a  $75-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas (hasta peso constante). El contenido acuoso de la muestra se obtuvo por diferencia de peso de la muestra (Cunniff, 1999). Los resultados se expresaron en g/100g de muestra.

### **2.1.2- Determinación del contenido de grasa.**

La determinación de grasa se efectuó sobre alícuotas de la carcasa previamente deshidratadas. Básicamente la determinación se llevó a cabo por pesada luego de una extracción utilizando como solvente éter de petróleo. Para la extracción se utilizó un equipo Twysselman (Cunniff, 1999). Los resultados se expresaron en g/100g de muestra.

### **2.1.3- Determinación del contenido proteico.**

El nitrógeno presente en 2g de carcasa molida no deshidratada fue convertido a sulfato de amonio y cuantificado por el método de Kjeldhal. El contenido de proteínas se estimó multiplicando el contenido de nitrógeno de la muestra por 6,25. (Cunniff, 1999). Los resultados se expresaron en g/100g de muestra.

### **2.1.4- Determinación del contenido de cenizas.**

Las cenizas fueron determinadas por el método de incineración única. Alícuotas de aproximadamente 1g de carcasa molida deshidratada fueron incineradas en mufla a una temperatura de 550°C hasta la obtención de cenizas blancas, enfriadas en desecador y pesadas rápidamente luego de alcanzar la temperatura ambiente (Cunniff, 1999). Los resultados se expresaron en g/100g de muestra.

## **2.2- Determinación de la actividad Lipoproteína Lipasa (LPL) en tejido adiposo**

La actividad LPL en tejido adiposo epididimal se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Martín-Hidalgo y col. (1994). Brevemente, un trozo de

tejido adicionado de buffer tris (hidroximetil) aminometano (Tris)-HCl 0,2 mM pH=8,2 a 4°C, en una proporción de 0,2 g/ml, se homogeneizó en un homogeneizador del tipo Potter-Elvehjen manteniendo dicha temperatura. A una alícuota del homogeneizado se le agregó suero inactivado por calentamiento a fin de favorecer la precipitación de proteínas y realizar la preparación del polvo de acetona. Esta última consiste en una doble extracción con acetona (-20°C) (proporción 1:6) y una doble extracción con éter dietílico (-20°C) en la misma proporción anterior. El precipitado obtenido (polvo de acetona) fue llevado a sequedad bajo corriente de N<sub>2</sub> (1 hora a 4°C). Las muestras se procesaron por duplicado.

El polvo de acetona, utilizado como fuente de la enzima, fue resuspendido en buffer NH<sub>4</sub>OH-NH<sub>4</sub>Cl 0,05 M pH=8,1 en ausencia y en presencia de NaCl 2M. De acuerdo con la técnica descrita por Nilsson-Ehle y Schotz (1976), una alícuota de dicha suspensión fue incubada durante 1 hora a 37°C en un baño tipo Dubnoff con agitación en presencia de un medio de incubación que contiene trioleína como sustrato. Dicho sustrato fue preparado por sonicación de trioleína (5.66 μmol/ml) en buffer Tris-HCl pH=8,0, utilizando lecitina (0,3 mg/ml) como emulsionante, albúmina sérica bovina (1g/100ml) y suero inactivado de rata (8,33%). La incubación se lleva a cabo utilizando 1vol. de sustrato más 1 vol. de enzima o de buffer.

Finalizado el período de incubación, la reacción fue detenida por el agregado de una mezcla SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 1N: n-heptano: alcohol isopropílico (0,1/ 1/ 4 – v/v/v) de acuerdo a la técnica descrita por Dole y col. (1960). Los ácidos grasos liberados durante la incubación fueron aislados usando un sistema de partición líquido-líquido. A un pH=2,5 la máxima cantidad de ácidos grasos se distribuye en la fase superior no polar. Una alícuota de dicha fase es titulada con OHNa en presencia de azul de timol como solución indicadora, siempre bajo corriente de N<sub>2</sub>. Como patrón de referencia se utilizó ácido palmítico recristalizado y disuelto en heptano.

La actividad LPL se determinó sustrayendo la actividad lipolítica no específica (determinada en presencia de NaCl 2M) de la actividad lipolítica total (determinada en ausencia de NaCl 2M). Los resultados se expresaron como pKatal (pmol/seg).

## 2.3- Estudios que analizan los mecanismos de la hipertrigliceridemia.

### 2.3.1- Velocidad de secreción de triglicéridos hepáticos (VSTG)

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

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

VSTG: velocidad de secreción plasmática de triglicéridos

TG<sub>120</sub>: concentración (nmol/l) de triglicéridos plasmáticos al tiempo 120 min.

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

V<sub>p</sub>: volumen plasmático (ml)

P: peso del animal en gramos

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

1000: factor para corregir las unidades de volumen

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

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

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

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

$$\text{Pool de TG plasmáticos (nmol/100g de rata)} = [TG_0] \times \frac{V_p}{P} \times 100$$

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

V<sub>p</sub>: volumen plasmático (ml)

P: peso del animal en gramos

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

### **2.3.2- Test de tolerancia grasa endovenoso: determinación de la velocidad de remoción de triglicéridos plasmáticos**

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

El test se llevó a cabo en todos los lotes de estudio con animales ayunados 16-18 hs a los cuales se inyectó por vía endovenosa 0,1 ml/100g de peso corporal de Intralipid al 10% (Lote M.R.50818B, Kabivitrum, Inc Alameda Ca, USA) como describimos en trabajos previos del grupo (Chicco y col.,2000). Se recolectaron muestras de sangre heparinizada (0.2-0.3 ml) inmediatamente antes y en forma seriada entre 2 y 30 minutos luego de la inyección y se mantuvieron a 0-4 °C hasta finalizar el test. Posteriormente dichas muestras se centrifugaron a 600 rpm (60 x g) durante 10 minutos a esa temperatura. Se recolectó el plasma libre de glóbulos rojos y se repitió la centrifugación bajo las mismas condiciones para eliminar cualquier remanente de glóbulos rojos. Una alícuota del plasma (0,2 ml) se diluyó a 10 ml con solución fisiológica y se midió la dispersión de la luz por nefelometría. Se realizó una curva de calibrado usando una dilución en solución salina 1/2000 del mismo batch de Intralipid como describiera Lewis y col. (1972). Todas las lecturas nefelométricas se ajustaron sustrayéndoles un blanco salino. El valor del tiempo cero se restó de los valores de cada muestra post-inyección. Los valores obtenidos se

graficaron en escala semilogarítmica en función del tiempo. Se calculó la constante cinética de primer orden  $K_2$  de eliminación de la emulsión grasa de circulación sanguínea (velocidad de remoción fraccional:  $K_2 \text{ \%min}^{-1}$ ) por el método de los cuadrados mínimos.

## **2.4- Homeostasis de la glucosa y secreción insulínica en islotes perifundidos.**

### **2.4.1- Determinación de la actividad Glucógeno Sintasa**

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

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

Brevemente, el tejido muscular fue homogeneizado en un buffer Tris-HCl 50 mM (pH= 6.8) conteniendo NaF 100 mM, EDTA 10 mM, glucógeno 0,5% (p/v) y ditioneitol (DTT) 5 mM. Una alícuota de homogeneizado fue agregada a un medio de reacción conteniendo Tris 50 mM (pH=7,5), EDTA 10 mM, glucógeno 1% (p/v), UDP-glucosa 1,5 mM, UDP-<sup>14</sup>C glucosa (actividad específica: 267  $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ ), y G-6-P 0.1 mM (baja concentración de G-6-P) o 10mM (elevada concentración de G-6-P) e incubada 7 min. a 37 °C. La reacción se detiene pasando cada una de las muestras en columnas conteniendo una resina de intercambio aniónico Dowex 1 x 8, 100-200 mesh para aislar el glucógeno

marcado generado. Posteriormente las columnas fueron lavadas dos veces con agua bidestilada, recolectando el eluido en miniviales de centelleo. A los mismos se les adicionó una mezcla de centelleo constituida por 1 volumen de tolueno, 1 volumen de Triton X-100, 60 mg de POPOP (1,4 bis [5-fenil-2-oxazolil]-benceno;2,2'-p-fenileno-bis[5-feniloxazol]) y 5 gramos de PPO (2,5-difeniloxazol)/L. Finalmente, cada minivial fue cuantificado por centelleo líquido.

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

#### **2.4.2-Determinación de Glucógeno en músculo gastrocnemio**

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

#### **2.4.3- Perifusión de islotes pancreáticos aislados: Secreción de insulina frente a diferentes secretagogos.**

#### **2.4.3.1- Aislamiento y perfusión de los islotes:**

Los animales (6 de cada grupo dietario) ayunados 12 horas fueron decapitados; los islotes pancreáticos se aislaron por digestión con colagenasa y se colectaron bajo microscopio estereoscópico (Lacy y Kostianovsky, 1967) como se describió en trabajos previos (Chicco y col, 2003). Brevemente, el páncreas extraído del animal se sumergió en un pequeño volumen de Buffer Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) (gaseado durante 10' con una mezcla 5% CO<sub>2</sub>: 95% O<sub>2</sub>) y se procedió al lavado trabajando en frío (0-4 °C). Luego de cortar el páncreas en trozos pequeños se agregó colagenasa (Sigma C-9263 tipo V para aislamiento de islotes pancreáticos), siguiendo el proceso de digestión bajo lupa. Cuando la digestión se completó, se procedió a detener la misma con el agregado de buffer frío y los islotes se separaron por decantación o centrifugación a baja velocidad. Una vez aislados, los islotes fueron lavados dos veces con buffer bicarbonato Krebs-Ringer (KRB) y colocados en grupos de 30-40 islotes en cámara de 13 mm conteniendo un filtro de membrana de nylon de 5 µm. Los islotes fueron perfundidos de acuerdo a la técnica de Burr y col. (1969) con KRB conteniendo: glucosa 3 mM, albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos 250 mg/l, dextrán-70 40mg/l a pH 7,4 y 37°C, constantemente gasificado con una mezcla de CO<sub>2</sub> 5% y O<sub>2</sub> 95%) a flujo constante de 0,9-1,2 ml/min durante 30 minutos. Finalizado este período de lavado, se obtuvieron dos muestras basales para el dosaje de insulina.

#### **2.4.3.2- Perfusión frente a estímulo de glucosa 16,5 mM.**

Posteriormente al período de lavado, los islotes de cada grupo dietario fueron perfundidos con KRB adicionado de glucosa 16,5 mM durante un período de 40 minutos. Durante los primeros 15 minutos se recogieron alícuotas de efluente con intervalos de 1 minuto y a partir del minuto 16 a intervalos de 5 minutos hasta los 40 minutos. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta la determinación de los niveles de insulina inmunoreactiva como se describió anteriormente.

#### **2.4.3.3- Perfusión frente a estímulo de arginina**

Con el fin de comparar el efecto de otro secretagogo sobre la secreción de insulina, la perfusión se realizó como se describió anteriormente, en presencia

de buffer KRB conteniendo glucosa 5 mM y arginina 20 mM. Las muestras para el dosaje de insulina fueron recogidas a los mismos intervalos de tiempo mencionados en el ítem anterior y conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

#### **2.4.3.4- Test de tolerancia endovenoso a la glucosa (TTEV)**

Adicionalmente se efectuó el TTEV a un grupo de animales de los lotes alimentados con las diferentes dietas de acuerdo a la técnica descrita en trabajos previos (Lombardo y col, 1983). Brevemente los animales ayunados 18 hs recibieron una dosis de glucosa por vía endovenosa de 2.5 g/100g de peso corporal. Se extrajeron muestras de sangre a tiempo 0 (antes la inyección) y luego en forma seriada durante los 60 minutos posteriores a la infusión de glucosa. Las ratas fueron mantenidas a la temperatura a  $28^{\circ}\text{C}$  durante toda la experiencia, siguiendo la metodología de Phenos y col (1971).

## **IV – REACTIVOS**

Los reactivos enzimáticos, sustratos y coenzimas utilizados en las técnicas previamente descritas fueron provistos por SIGMA (St Louis, Mo., USA) o Boheringer Mannheim (Indianápolis. Ind., USA). Los reactivos radioactivos fueron provistos por Amersham Biosciences. Los demás compuestos químicos son de grado analítico (máxima pureza) disponibles comercialmente.

## **V.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES**

Los resultados experimentales fueron expresados como media  $\pm$  SEM (desviación estandar estimada de la media). Las diferencias estadísticas entre grupos dietarios fueron analizadas por test “t” de Student o ANOVA (análisis de varianza) y posterior inspección de diferencias por el test de Newman Keuls o Scheffe’s (Snedecor y Cochran, 1967). Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

# **RESULTADOS**

## **TRABAJO EXPERIMENTAL**

### **PRIMERA PARTE: ESTUDIO A DIFERENTES TIEMPOS DE INGESTA**

Como mencionamos en el capítulo Introducción, ratas normales alimentadas crónicamente (30 semanas) con una dieta rica en sacarosa (DRS) desarrollan dislipemia, moderada hiperglucemia y resistencia insulínica periférica global. Estas alteraciones se acompañan de moderado incremento de la ingesta calórica inducido por la DRS que se refleja en un incremento del peso corporal y del tejido adiposo visceral. En este modelo, la dislipemia parece jugar un rol importante en la sensibilidad insulínica y en la homeostasis de la glucosa.

Con el objeto de analizar la posibilidad de revertir o mejorar estas alteraciones el primer objetivo de esta Tesis fue reducir el porcentaje de sacarosa dietaria (63% a 20%) durante un período de tiempo y establecer el tiempo más adecuado en el cual se puedan verificar las modificaciones más relevantes en las anomalías descritas en este modelo nutricional en el largo plazo.

Para lograr este objetivo se alimentaron dos lotes de animales, uno con DC y otro con DRS 63% durante 30 semanas. Al cabo de este tiempo el grupo DRS 63% se dividió aleatoriamente en dos subgrupos, uno continuó con la misma dieta y al otro se le suministró la DRS 20% hasta finalizar la experiencia. Se procedió al sacrificio de los animales en forma secuencial a las semanas 30, 34, 38 y 42 utilizando los protocolos experimentales citados en el apartado de Materiales y Métodos. Del mismo modo, el procesamiento de la muestras se llevó a cabo de acuerdo a las técnicas ya descritas en dicho apartado.

## **RESULTADOS**

### **1- Ingesta calórica, incremento de peso y eficiencia.**

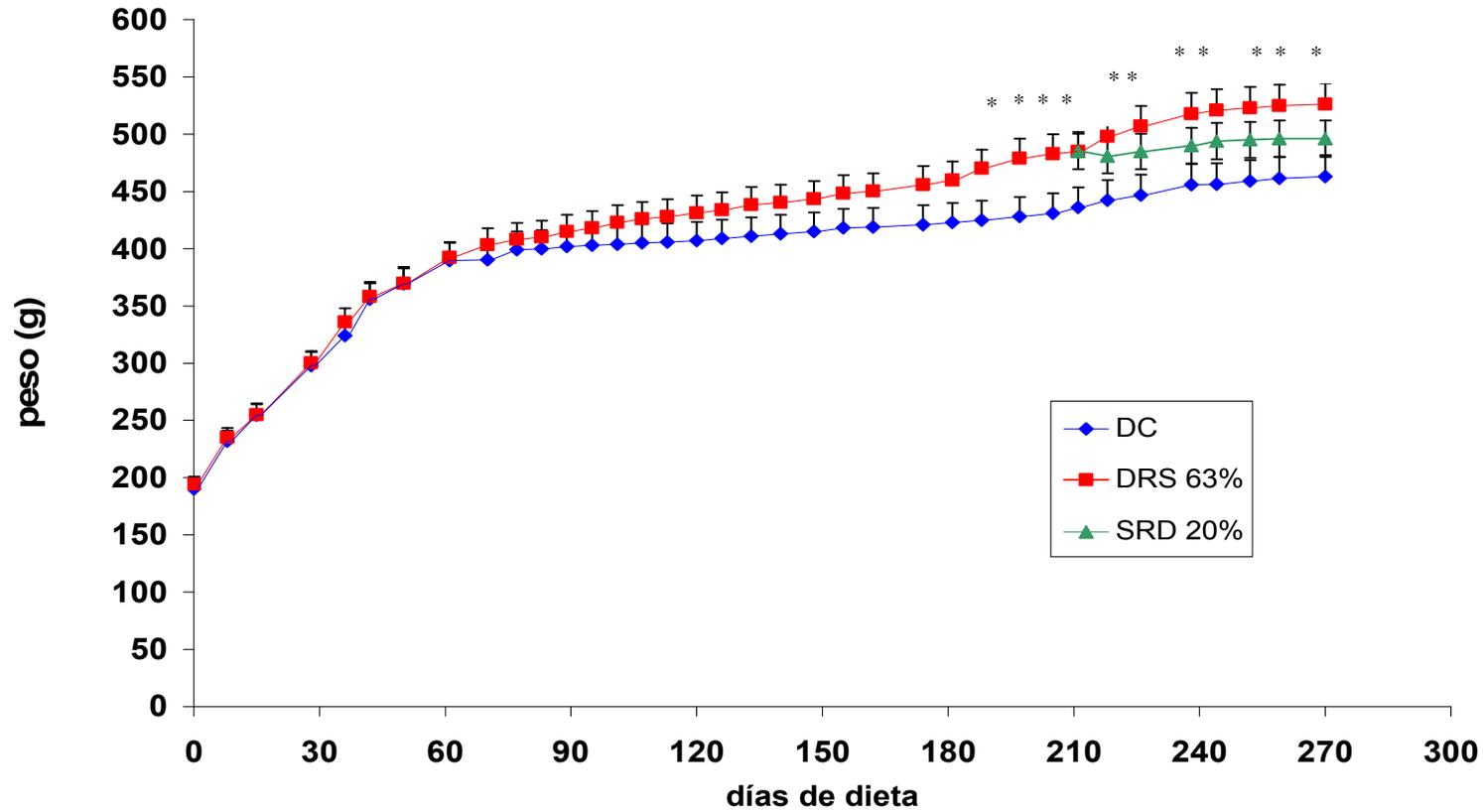
Como se demostrara previamente (Chicco y col, 2000 y 2003) si bien el peso de los animales al iniciar la experiencia fue similar (DC:  $190.2 \pm 9.9$  g, n=8; DRS 63%:  $194.0 \pm 3.5$  n=24; expresados como media  $\pm$  SEM), una vez alcanzadas las 30 semanas de ingesta el peso en las ratas alimentadas con DRS 63% fue significativamente mayor al observado en los respectivos controles etarios alimentados con DC (**Fig. 3**). Las diferencias antes mencionadas se mantienen aún cuando la DRS se extiende hasta la semana 42.

La reducción en el contenido de sacarosa dietaria (63 a 20%) durante el período 30-42 semanas indujo un menor incremento, aunque aún no significativo, del peso corporal (aproximadamente del 10%). Los valores promedio obtenidos fueron: media  $\pm$  SEM, n=8;  $443.5 \pm 18.9$  para DC,  $509.8 \pm 22.5$  para DRS 63% y  $496.0 \pm 17.0$  para DRS 20%; DC vs DRS 63%  $p < 0.05$ .

La **Fig. 4** muestra los cambios secuenciales de la ingesta calórica en los 3 grupos experimentales. El grupo alimentado con DRS 20% alcanza los valores del control al cabo de 12 semanas del cambio en la proporción de la sacarosa de la dieta.

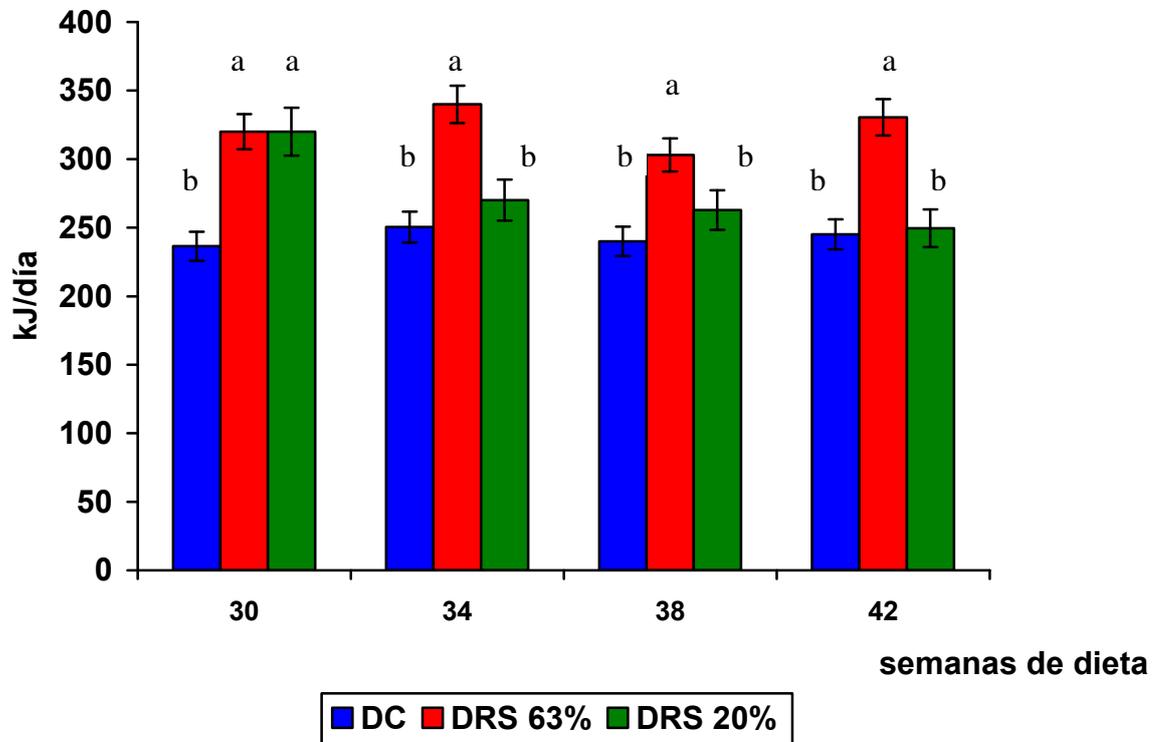
La energía ingerida por cada gramo de peso corporal ganado, denominada “eficiencia” fue determinada como un indicador digestivo y metabólico de la facilidad con que la energía consumida se adiciona al peso corporal (Roberts y col, 2001). Al finalizar el período experimental la eficiencia de la dieta fue semejante en los 3 grupos experimentales (DC: 565.9, DRS 63%: 577.1, DRS 20%: 543.3).

Figura 3. Ganancia de peso de los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales.



Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM y corresponden al menos a 8 ratas en cada grupo dietario. \* $p < 0.05$  DRS 63% vs DC; DRS 20%  $p = \text{NS}$  vs DC y DRS 63%.

**Figura 4. Modificaciones de la ingesta calórica de los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales.**



Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (n=8). Las barras que no comparten la misma letra a cada tiempo de experiencia son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

## **Peso de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal.**

El peso relativo (g/100g peso corporal) de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal se observa en la **Tabla 2**.

El peso del tejido adiposo (epididimal y retroperitoneal) se incrementó significativamente en los animales alimentados con DRS 63% comparado con el grupo control en cada uno de los tiempos analizados. Respecto a la dieta DRS 20% el peso del tejido adiposo, tanto epididimal como retroperitoneal, disminuyó significativamente a partir de las 8 semanas del cambio de dieta cuando se comparó con el grupo alimentado con DRS 63%. Sin embargo los valores obtenidos son aún significativamente mayores a los observados en el grupo control.

## **3- Niveles de Triglicéridos (TG) y Ácidos Grasos No Esterificados (AGNE) plasmáticos.**

La dislipidemia (incremento de TG y AGNE plasmáticos) presente a las 30 semanas en los animales alimentados con DRS 63% se mantiene elevada dentro de niveles semejantes hasta las 42 semanas de ingesta cuando se compara con ratas del mismo sexo y edad alimentadas con DC.

Cuando la sacarosa es sustituida parcialmente por almidón (DRS 20%) los niveles de TG plasmáticos descienden secuencialmente, alcanzando niveles semejantes al control a las 12 semanas posteriores al cambio de dieta. Los niveles de AGNE plasmáticos se comportan de la en forma similar aunque, a diferencia de los TG no alcanzan los valores controles aún después de las 12 semanas con DRS 20% (**Fig. 5**).

**Tabla 2. Pesos de tejido adiposo epididimal (2A) y retroperitoneal (2B) expresados en forma relativa al peso corporal (g/ 100 g) en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales.**

**Tabla 2A**

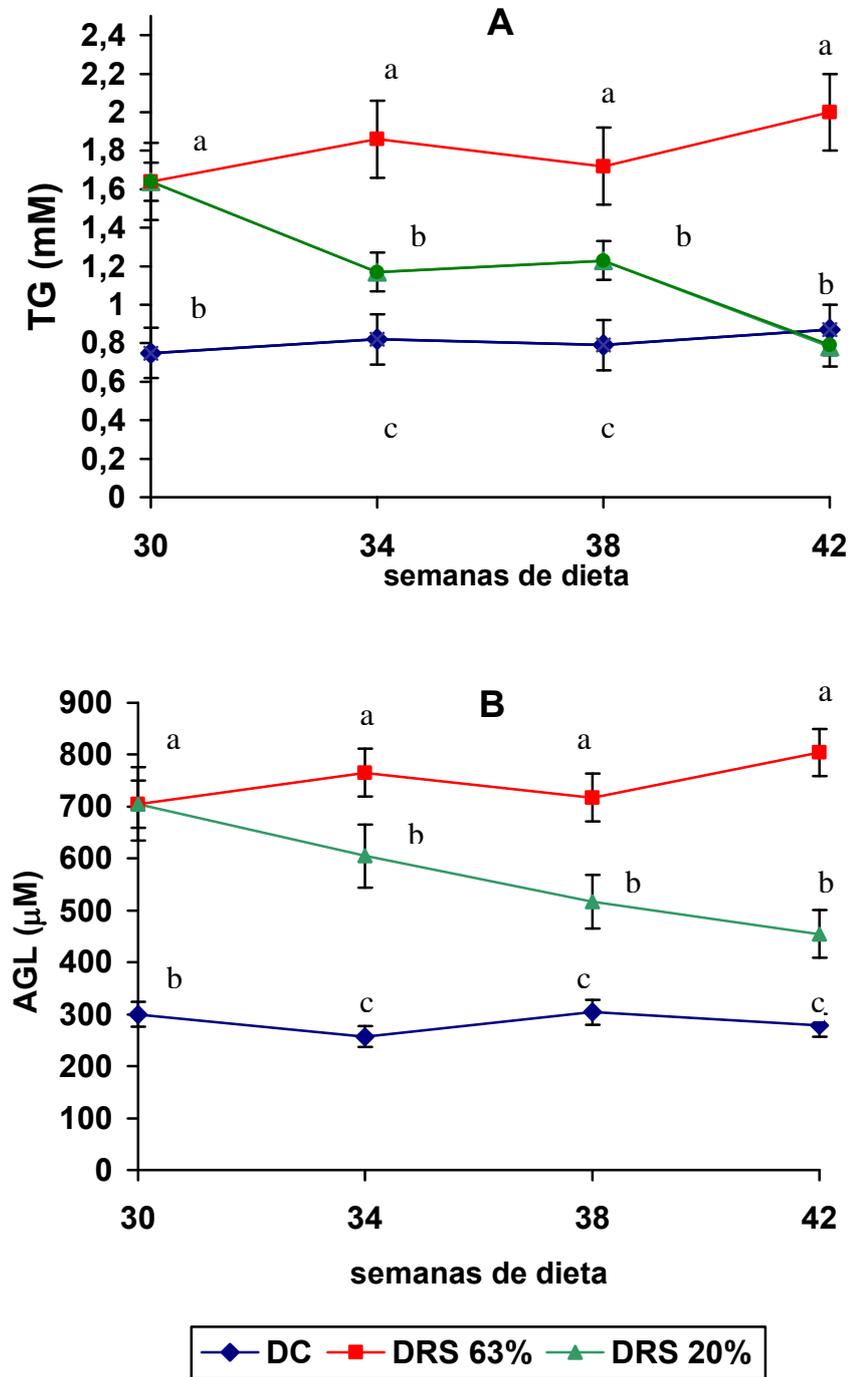
Semanas de dieta	Tejido adiposo epididimal		
	DC	DRS 63%	DRS 20%
30	1.38 ± 0.14 <sup>b</sup>	2.25 ± 0.18 <sup>a</sup>	-
34	1.35 ± 0.12 <sup>b</sup>	2.21 ± 0.15 <sup>a</sup>	2.32 ± 0.16 <sup>a</sup>
38	1.70 ± 0.18 <sup>c</sup>	2.83 ± 0.15 <sup>a</sup>	2.27 ± 0.16 <sup>b</sup>
42	1.64 ± 0.05 <sup>c</sup>	3.27 ± 0.18 <sup>a</sup>	2.20 ± 0.17 <sup>b</sup>

**Tabla 2B**

Semanas de dieta	Tejido adiposo retroperitoneal		
	DC	DRS 63%	DRS 20%
30	1.15 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.80 ± 0.16 <sup>a</sup>	-
34	1.17 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.83 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.85 ± 0.10 <sup>a</sup>
38	1.32 ± 0.24 <sup>c</sup>	2.97 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.05 ± 0.21 <sup>b</sup>
42	1.37 ± 0.13 <sup>c</sup>	3.16 ± 0.18 <sup>a</sup>	2.23 ± 0.09 <sup>b</sup>

Los valores se expresan como media ± SEM, n=8 en cada grupo dietario. Los valores en cada línea que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes (p<0.05).

Figura 5. Niveles de triglicéridos (TG) y ácidos grasos no esterificados (AGNE) plasmáticos en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales.



Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM y corresponden al menos a 6 ratas en cada grupo dietario. Los valores en cada tiempo que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

#### **4- Niveles de Glucosa (G) e Insulina (I) plasmáticos**

La hiperglucemia estable presente durante todo el período experimental en los animales con DRS 63% desciende significativamente a partir de las 4 semanas cuando se cambia la proporción de sacarosa de la dieta y permanece en estos niveles hasta la semana 42 (aunque sin alcanzar los valores presentes en los animales alimentados con DC) (**Fig 6A**).

Los niveles de insulina plasmática no se modificaron en los tres grupos dietarios a lo largo de todo el período experimental (**Fig.6B**).

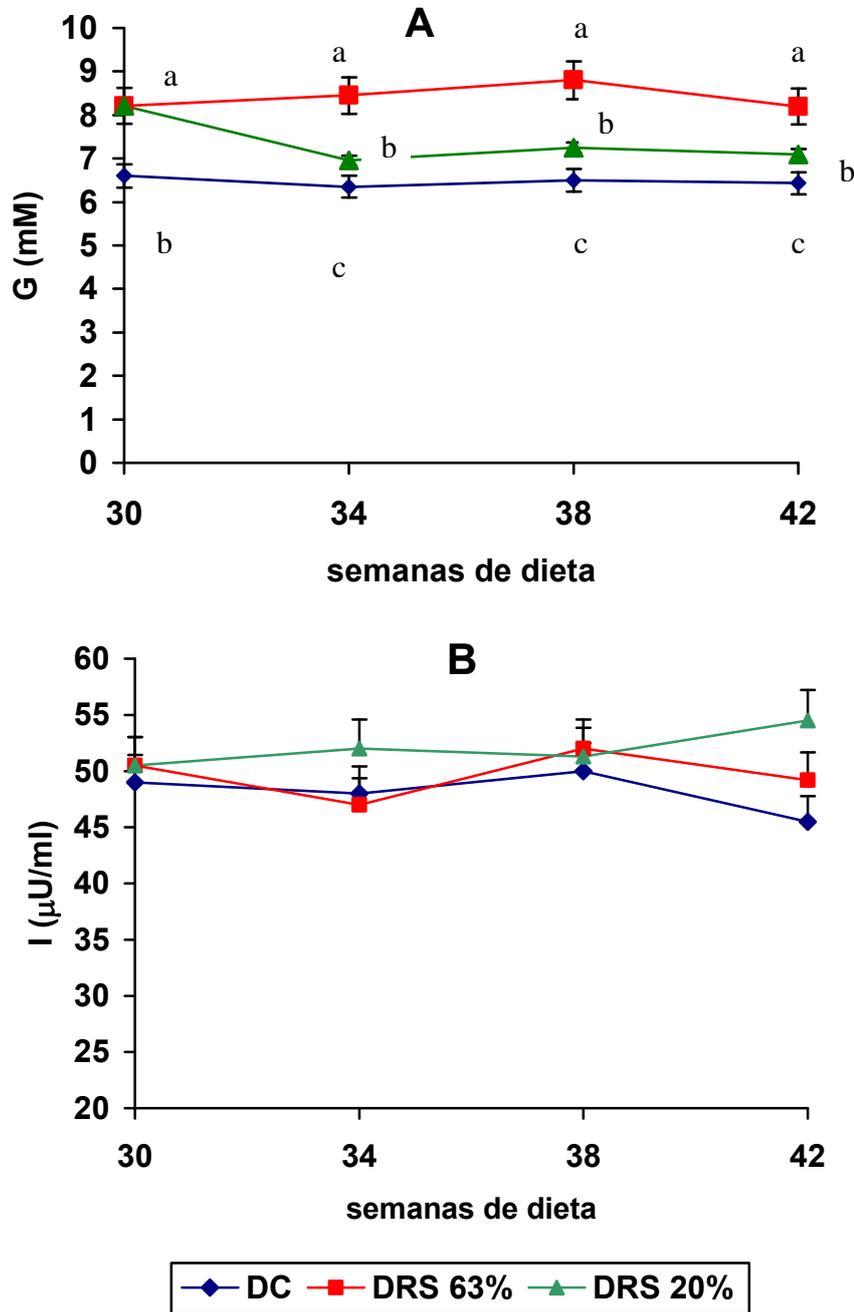
#### **5- Contenido de triglicéridos hepáticos y musculares.**

El elevado contenido de TG hepáticos observados hasta las 30 semanas de ingesta continúa con niveles semejantes hasta la semana 42 respecto a los animales alimentados con DC.

Cuando se sustituyó parcialmente la sacarosa dietaria (DRS 20%) el contenido de triglicéridos hepáticos comenzó a descender a la semana 34 de ingesta, continuando en este perfil hasta la semana 42 pero sin llegar a normalizarse. Al finalizar el período experimental el contenido de triglicéridos hepáticos es aún significativamente mayor que el observado en los animales de igual sexo y edad alimentados con DC (**Fig 7**).

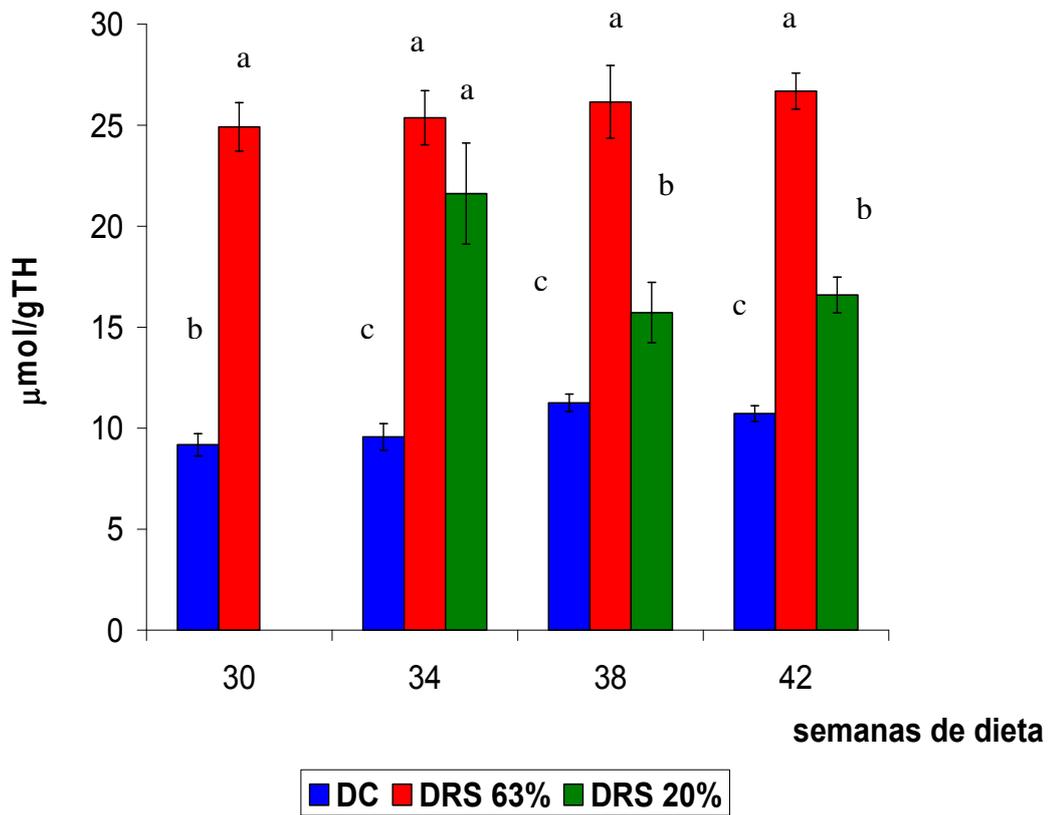
En relación al contenido de triglicéridos en los músculos esquelético (gastrocnemio) y cardíaco no se observaron diferencias significativas en el grupo de ratas en que se sustituyó isocalóricamente el porcentaje de sacarosa dietaria. En ambos grupos (DRS 63% y DRS 20%) el contenido de triglicéridos en los tejidos mencionados fue significativamente mayor que el de sus respectivos controles etarios (**Tabla 3**).

Figura 6. Niveles de glucemia (G) e insulinemia (I) en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales.



Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM y corresponden al menos a 6 ratas en cada grupo dietario. Los valores en cada tiempo que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

**Figura 7. Contenido de triglicéridos hepáticos en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales.**



Los valores se expresan en como media  $\pm$  SEM (n=6 en cada grupo dietario). Los valores en cada tiempo que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 3. Contenido de triglicéridos en músculo esquelético (gastrocnemio) y músculo cardíaco de ratas alimentadas las diferentes dietas experimentales.**

**Tabla 3A**

Semanas de dieta	Músculo esquelético		
	DC	DRS 63%	DRS 20%
<b>30</b>	2.98 ± 0.29 <sup>b</sup>	6.88 ± 0.65 <sup>a</sup>	-
<b>34</b>	3.01 ± 0.36 <sup>b</sup>	7.30 ± 0.72 <sup>a</sup>	6.13 ± 0.52 <sup>a</sup>
<b>38</b>	2.45 ± 0.32 <sup>b</sup>	6.72 ± 0.63 <sup>a</sup>	6.64 ± 0.65 <sup>a</sup>
<b>42</b>	3.85 ± 0.52 <sup>b</sup>	7.18 ± 0.60 <sup>a</sup>	5.70 ± 0.78 <sup>a</sup>

**Tabla 3B**

Semanas de dieta	Músculo cardíaco		
	DC	DRS 63%	DRS 20%
<b>30</b>	3.15 ± 0.21 <sup>b</sup>	6.70 ± 0.40 <sup>a</sup>	-
<b>34</b>	3.06 ± 0.16 <sup>b</sup>	6.69 ± 0.37 <sup>a</sup>	6.42 ± 0.21 <sup>a</sup>
<b>38</b>	3.40 ± 0.42 <sup>b</sup>	6.73 ± 0.19 <sup>a</sup>	6.54 ± 0.55 <sup>a</sup>
<b>42</b>	3.94 ± 0.18 <sup>b</sup>	6.63 ± 0.35 <sup>a</sup>	6.19 ± 0.86 <sup>a</sup>

Los valores se expresan como media ± SEM (n=6 en cada grupo dietario) en µmol/g tejido húmedo para cada una de las dietas. Los valores en cada línea que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes (p<0.05).

## **En conclusión:**

Los resultados hasta aquí expuestos nos señalan que la sustitución parcial del contenido de sacarosa en la dieta (63% a 20%), durante 12 semanas, es capaz de modificar secuencialmente algunas alteraciones bioquímico-metabólicas características de la dislipemia y la resistencia insulínica estable presente en animales alimentados crónicamente (30 – 42 semanas) con una dieta rica en sacarosa. Estos parámetros que incluyen modificaciones plasmáticas relacionadas al metabolismo lipídico (TG y AGNE) influencia el metabolismo de la glucosa. Al respecto la moderada hiperglucemia presente en los animales con DRS tiende a alcanzar valores normales. Lo mismo pudimos observar en relación a una reducción del contenido de grasa visceral y de la ingesta calórica. Un incremento de la grasa visceral, de lípidos a nivel plasmático y tisular y anormal homeostasis de la glucosa, son anomalías estrechadamente relacionadas con la insensibilidad insulínica.

Los mecanismos involucrados en la reversión y/o mejoramiento de la dislipidemia y homeostasis de la glucosa inducidas por una reducción del porcentaje de sacarosa de la dieta no han sido bien dilucidados. Este aspecto es evaluado como segundo objetivo de la presente tesis.

## **SEGUNDA PARTE: ESTUDIOS BIOQUÍMICOS- METABÓLICOS**

A partir de los resultados obtenidos previamente descritos nos propusimos analizar a las 42 semanas de ingesta:

1. Composición de la carcasa y actividad LPL del tejido adiposo epididimal.
2. Mecanismos involucrados en la hipertrigliceridemia: “in vivo” secreción hepática de VLDL-TG y remoción plasmática de triglicéridos.
3. Mecanismos relacionados con la homeostasis de la glucosa y secreción insulínica:
  - c) “in vitro” secreción de insulina en islotes pancreáticos aislados perifundidos frente a estímulo de diferentes secretagogos (glucosa, glucosa + arginina)
  - d) Contenido de glucógeno y actividad glucógeno sintasa en el músculo esquelético.

Para lograr los objetivos se alimentaron 2 grupos de ratas durante 30 semanas con dietas control (DC) o rica en sacarosa 63% (DRS 63%). Al cabo de este período el grupo DRS 63% se subdividió en dos subgrupos. El primer subgrupo continuó con la misma dieta y al segundo se le sustituyó parcialmente el contenido de sacarosa (63% a 20%) durante 12 semanas más. El grupo control continuó con la misma dieta hasta la semana 42. Más detalles de los grupos dietarios, componentes de las dietas y metodologías utilizadas fueron descritos en el Capítulo de Materiales y Métodos.

Los resultados alcanzados se describen a continuación.

## **RESULTADOS**

### **1. Composición de la carcasa**

La composición de la dieta puede influenciar el peso corporal y la composición de la carcasa (Suzuki y col, 1975). De acuerdo con los resultados descriptos en el capítulo anterior se analizó la composición de la carcasa en los tres grupos dietarios al finalizar el período experimental (42 semanas) (**Tabla 4**).

Los animales pertenecientes al grupo DRS 63% mostraron un significativo aumento en el peso de la carcasa cuando se compararon con los del grupo control. Esto se acompañó de un incremento en el contenido de grasa expresado tanto en forma absoluta como relativa, a expensas de una disminución del contenido de agua. Sin embargo, en este último punto debe mencionarse que el contenido de agua de la carcasa sólo disminuye significativamente cuando se expresa como porcentaje del peso húmedo.

En las ratas alimentadas con DRS 20%, el peso de la carcasa se redujo pero aún sin alcanzar los observados en el grupo control. Un comportamiento similar se obtuvo con el contenido de grasa, aunque en este caso la disminución respecto del grupo DRS 63% resultó significativa. Paralelamente el contenido de agua aumentó significativamente, alcanzando valores similares a los observados en ratas alimentadas con DC. El resto de los componentes analizados (proteínas y cenizas) no presentaron diferencias significativas en los diferentes grupos dietarios.

Observando el contenido graso de la carcasa resulta interesante la correlación directamente proporcional entre este parámetro y el peso del tejido adiposo retroperitoneal (**Fig. 8**).

Otro aspecto interesante en destacar son las correlaciones entre el peso corporal y los pesos del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal. Como

**Tabla 4. Composición de la carcasa en los animales alimentados las diferentes dietas experimentales a las 42 semanas de ingesta.**

Composición		DC	DRS 63%	DRS 20%
<b>Peso carcasa</b>	g	340.0 ± 6.9 <sup>b</sup>	411.1 ± 12.2 <sup>a</sup>	374.0 ± 13.8 <sup>a</sup>
<b>Grasa</b>	g/100 g TH	14.3 ± 0.9 <sup>c</sup>	25.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	18.9 ± 1.5 <sup>b</sup>
	g	53.4 ± 3.3 <sup>c</sup>	108.8 ± 9.9 <sup>a</sup>	70.1 ± 4.0 <sup>b</sup>
<b>Agua</b>	g/100 g TH	59.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	52.8 ± 1.2 <sup>b</sup>	57.3 ± 1.2 <sup>a</sup>
	g	221.4 ± 5.6 <sup>a</sup>	225.5 ± 6.4 <sup>a</sup>	214.9 ± 6.4 <sup>a</sup>
<b>Proteínas</b>	g/100 g TH	20.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	19.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	19.9 ± 0.6 <sup>a</sup>
	g	77.3 ± 208 <sup>a</sup>	82.0 ± 3.4 <sup>a</sup>	76.5 ± 3.4 <sup>a</sup>
<b>Cenizas</b>	g/100 g TH	4.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.2 <sup>a</sup>
	g	14.9 ± 0.6 <sup>a</sup>	15.8 ± 0.8 <sup>a</sup>	14.5 ± 1.0 <sup>a</sup>

Los valores se expresan como media ± SEM, n=6 en cada grupo dietario. Los valores en cada línea que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) cuando una variable fue comparada a un tiempo según el test de Newman-Keuls.

**Figura 8. Relación entre el peso del tejido adiposo retroperitoneal y el contenido de grasa de la carcasa en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales a las 42 semanas de ingesta.**

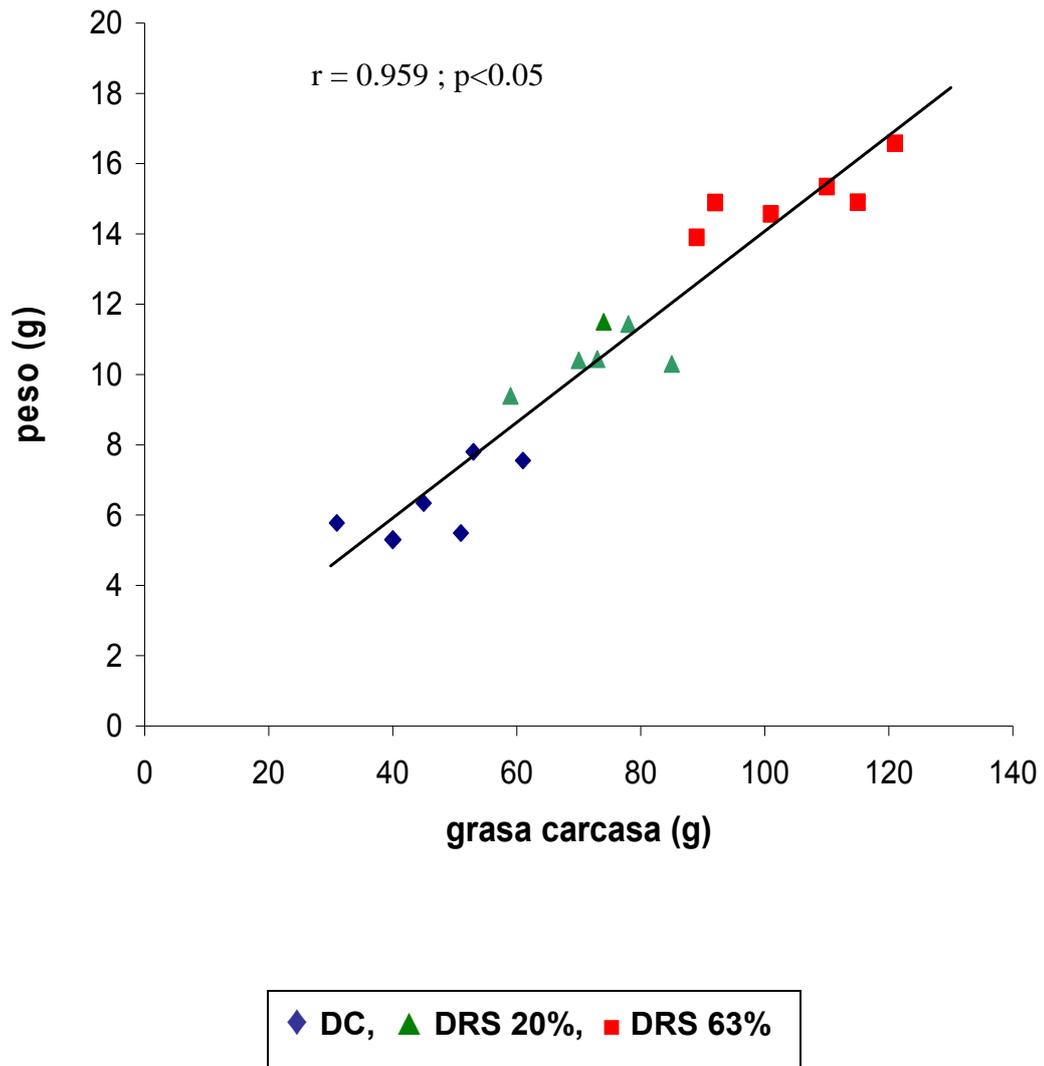


Figura 9. Relación entre el peso corporal y el peso del tejido adiposo epididimal en los animales alimentados con las diferentes dietas.

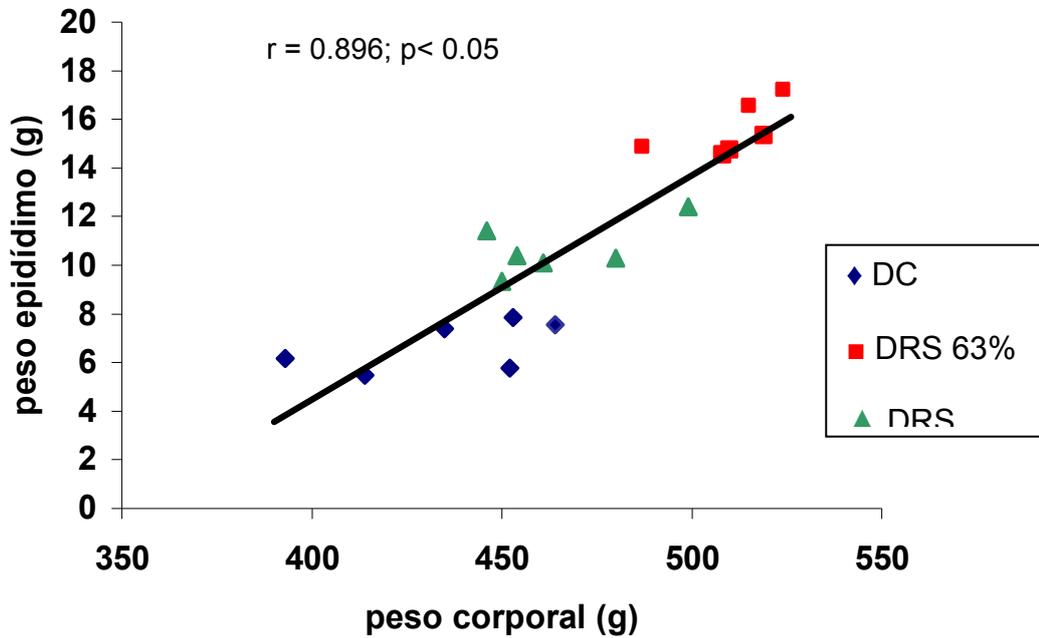
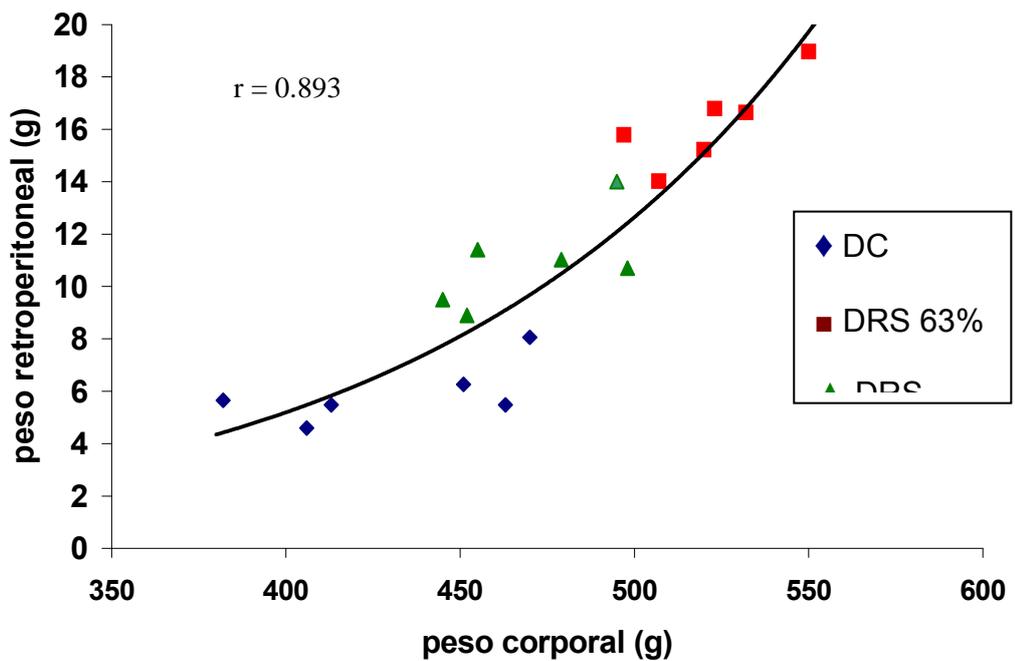


Fig 10. Relación entre el peso corporal y el peso del tejido adiposo retroperitoneal en los animales alimentados con las diferentes dietas.



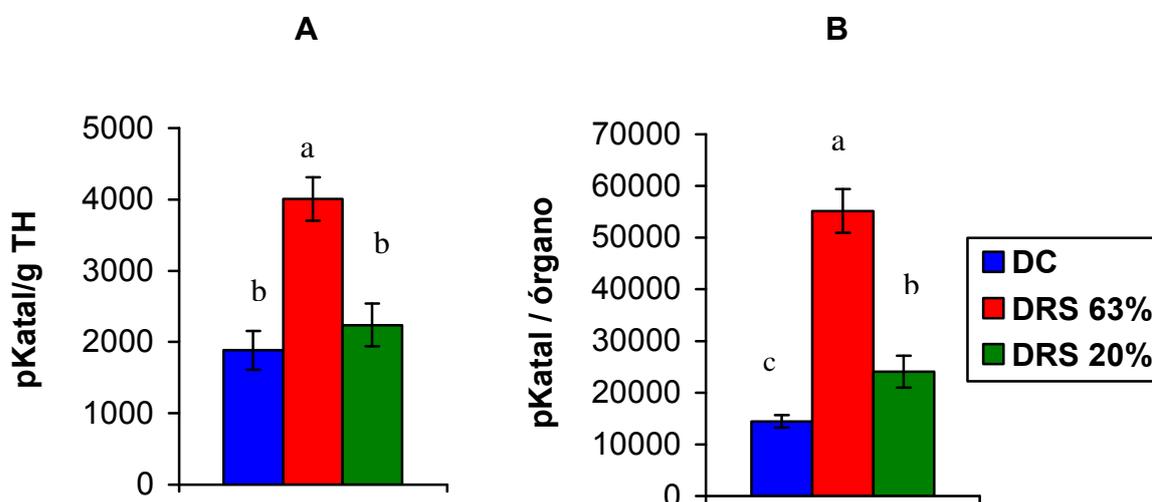
puede observarse en la **Fig. 9** esta correlación es directamente proporcional para el tejido adiposo epididimal mientras presenta una curva exponencial para el tejido adiposo retroperitoneal (**Fig. 10**).

## **2. Actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) en tejido adiposo epididimal**

El ingreso de los ácidos grasos provenientes de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones a la célula adiposa para ser utilizados por la misma es mediado por la acción de la enzima LPL, cuya actividad está regulada por factores hormonales y nutricionales (ayuno, alimentación, composición de la dieta, etc.)

Cambios en la actividad de la LPL pueden contribuir a la adiposidad observada en los animales con DRS 63%. Al respecto cuantificamos la actividad enzimática LPL en tejido adiposo epididimal en los tres grupos dietarios. En la **Figura 11 (A y B)** podemos observar un significativo incremento de la actividad LPL en los animales con DRS 63% cuando se los compara con las ratas alimentadas por igual tiempo con dieta control expresados por gTH u órgano total. La reducción del porcentaje de sacarosa en la dieta decrece la actividad enzimática alcanzando los valores controles cuando se expresa por gTH (**Fig. 11A**) siendo aún significativamente diferente cuando se lo expresa por órgano total (**Fig 11B**). Al respecto, la tabla inserta en la fig.11 muestra los pesos del tejido adiposo epididimal en valor absoluto.

**Fig. 11. Actividad enzimática de la lipoproteína lipasa (LPL) en tejido adiposo epididimal de los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales a las 42 semanas de ingesta.**



	Peso epidídimo (g)
DC	7.12 ± 0.58 <sup>c</sup>
DRS 63%	14.08 ± 0.79 <sup>a</sup>
DRS 20%	10.39 ± 0.36 <sup>b</sup>

Los valores se expresan como media ± SEM, n= 6 en cada grupo dietario. La tabla inserta muestra el peso total del tejido adiposo epididimal. Los valores en cada columna que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes (p<0.05).

### **3. Mecanismos involucrados en la hipertrigliceridemia: Estudios “in vivo”.**

#### **Secreción hepática de VLDL-TG.**

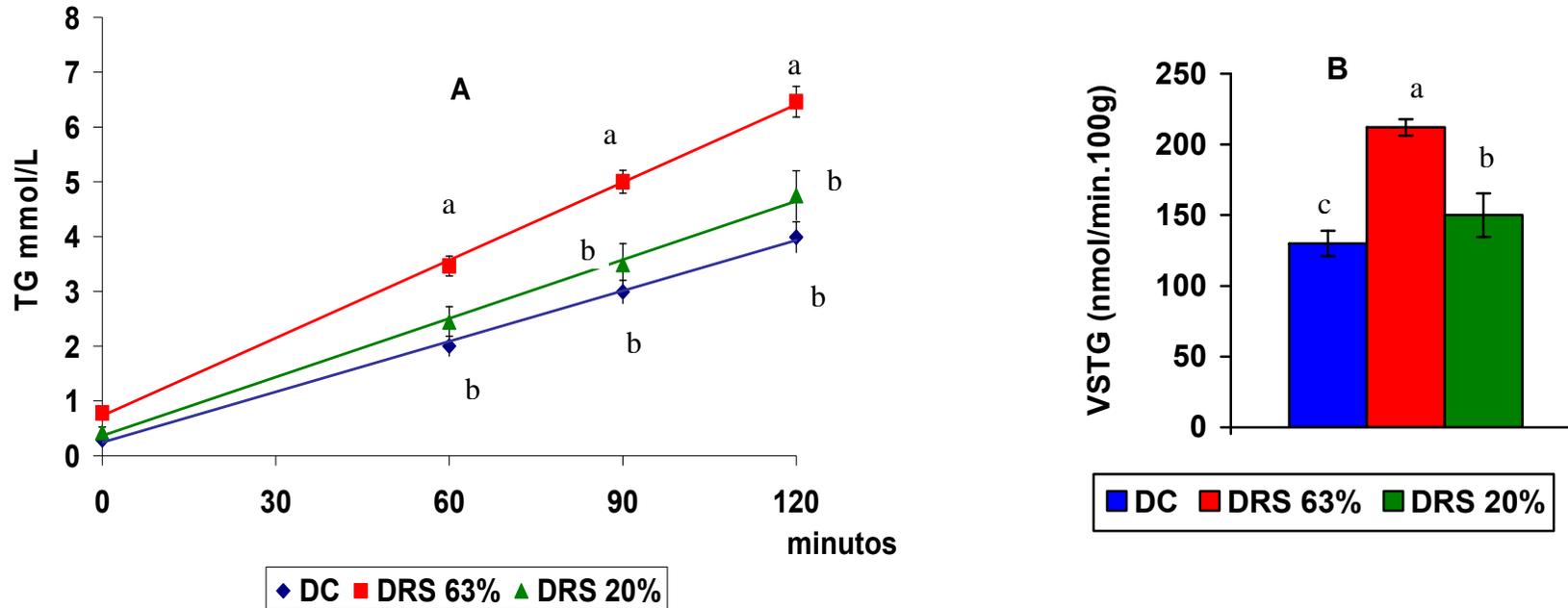
#### **Remoción de triglicéridos plasmáticos: Test de tolerancia grasa endovenoso.**

Como mencionamos en el capítulo anterior los animales alimentados durante 30-42 semanas con DRS 63% presentan niveles elevados de triglicéridos (TG) plasmáticos y hepáticos respecto al lote DC. Esto se acompaña de una elevada velocidad de secreción y disminuida velocidad de remoción plasmática de TG (**Fig. 12 y 13**).

El cambio en el porcentaje de sacarosa de la dieta durante las últimas 12 semanas experimentales normaliza los niveles de triglicéridos plasmáticos, la velocidad de secreción hepática (**Fig. 12 A y B**) y remoción plasmática de triglicéridos (**Fig.13**).

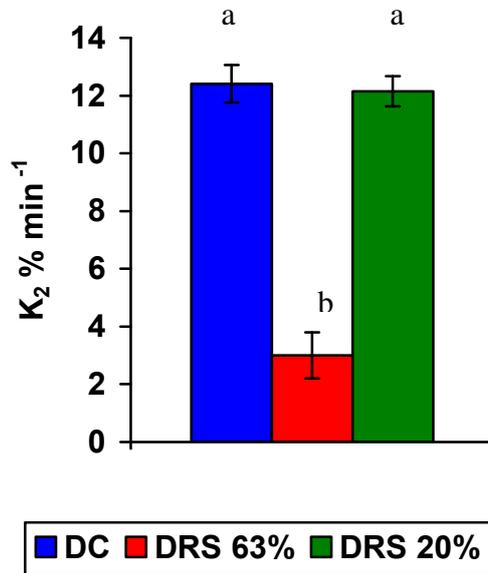
Una relación recíproca entre los niveles de triglicéridos plasmáticos en ayunas y la velocidad de remoción fraccional de la emulsión grasa puede observarse en la **Figura 14**.

Fig. 12. Secreción hepática de VLDL-TG en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales a las 42 semanas de ingesta.



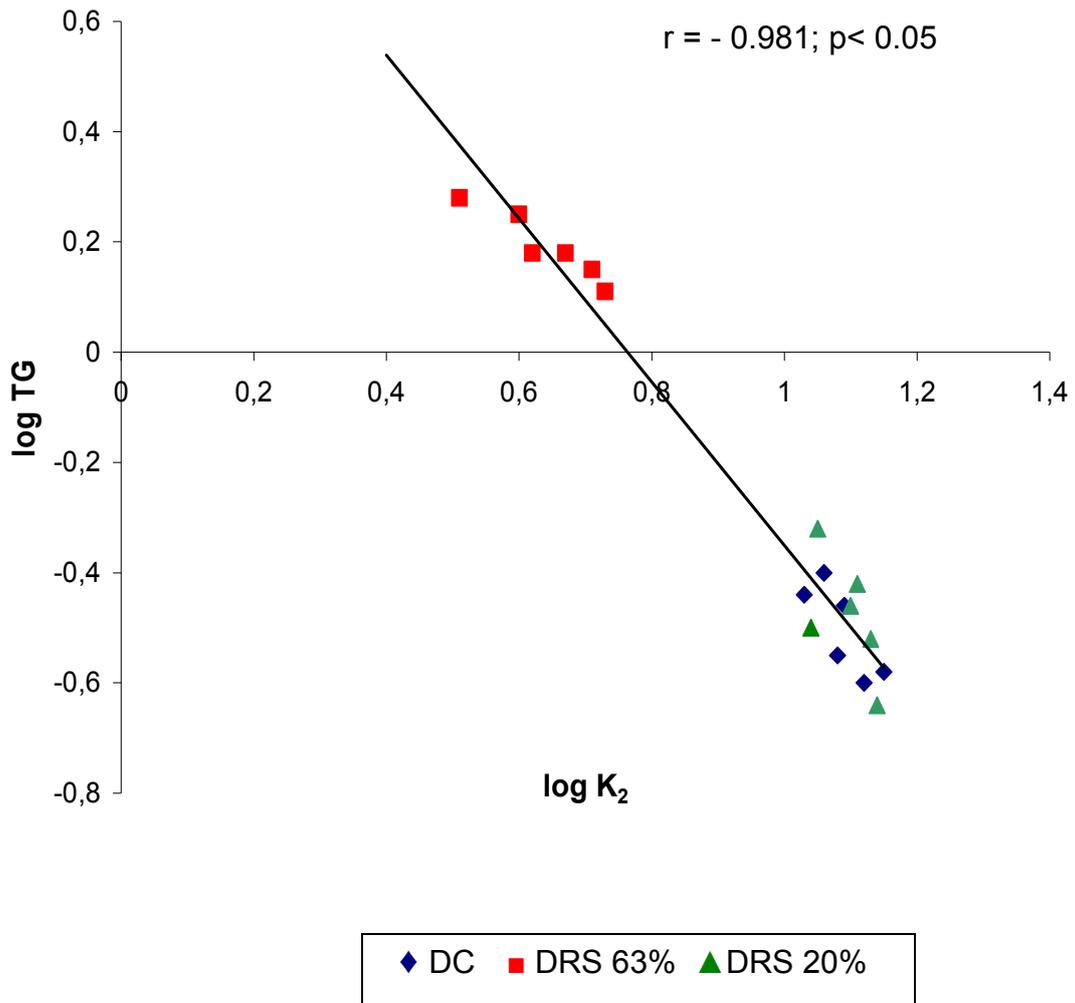
(12A) Acumulación plasmática de TG luego de la inyección de Triton WR1339. Cada punto representa media  $\pm$  SEM (n=6). Los valores que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) cuando fueron comparados a cada tiempo según el test de Newman-Keuls. (12B) Velocidad de secreción de TG hepáticos (VSTG). Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (n=6). Los valores que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

**Figura 13. Test de tolerancia grasa endovenoso. Determinación de la velocidad fraccional de remoción grasa (K<sub>2</sub>) en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales a las 42 semanas de ingesta.**



Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (n=6). Los valores que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes (p<0.05)

**Figura 14. Correlación entre los niveles de triglicéridos plasmáticos (TG) y la velocidad fraccional de remoción grasa ( $K_2$ ) en animales alimentados con las diferentes dietas a la semana 42.**



Los valores (n= 18) corresponden a los animales alimentados con las diferentes dietas.

## **5.Homeostasis de la glucosa y secreción insulínica en islotes pancreáticos.**

### **4.2- Homeostasis de la glucosa**

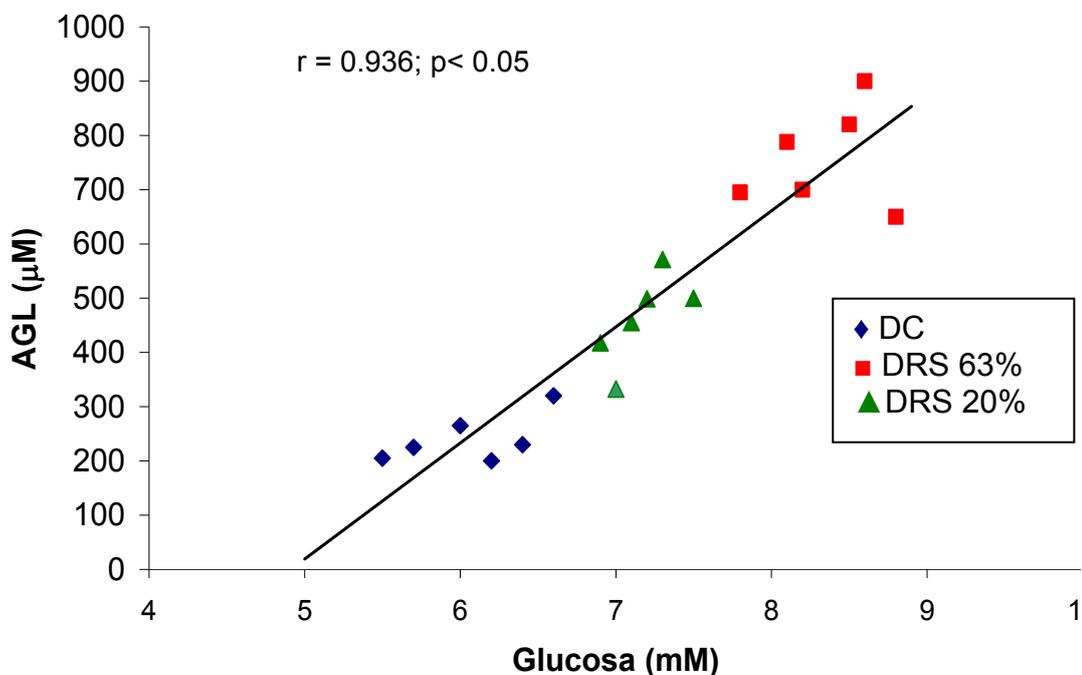
Un incremento en los niveles de lípidos plasmáticos y tisulares (fundamentalmente músculo esquelético) juega un rol importante en la homeostasis de la glucosa. Las ratas alimentadas crónicamente con DRS 63% muestran un significativo incremento en los niveles de glucosa basal, los cuales descienden significativamente sin alcanzar los niveles observados en las ratas alimentadas con dieta control (DC) cuando se sustituye parcialmente la sacarosa por almidón (DRS 20%). Estos cambios no se acompañan de cambios similares en los niveles de insulina plasmáticos.

En relación a lo antedicho en la **Figura 15** se observa una correlación positiva entre los niveles de glucemia y AGNE plasmáticos. Más aún la tabla inserta muestra que los niveles de TG dentro del músculo esquelético siguen un patrón semejante. Un mayor contenido de TG musculares se correlaciona con niveles elevados de glucemia y AGNE. Sin embargo, en dicho músculo en ninguno de los lotes experimentales se observaron cambios significativos en el contenido de glucógeno y de la actividad glucógeno sintasa. Los valores obtenidos se observan en la **Tabla 5**.

### **4.2- Secreción de insulina en islotes pancreáticos**

Bajo el estímulo de la Glucosa (16,5 mM) el grupo control muestra el clásico patrón bifásico de secreción de la hormona, con una primera fase secretoria cuyo pico se ubica entre los 4 y 5 minutos, seguida de una segunda fase que comienza hacia los 10 minutos y continúa hasta finalizar la experiencia (40 minutos). En los animales alimentados con DRS 63% se observa una clara alteración del patrón bifásico de la secreción de insulina bajo estímulo de la

**Figura 15. Correlación entre ácidos grasos no esterificados (AGNE) y glucemia en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales a las 42 semanas de ingesta.**



Contenido de TG en músculo esquelético	
Dieta	µmol/gTH
DC	3.85 ± 0.52 <sup>b</sup>
DRS 63%	7.18 ± 0.60 <sup>a</sup>
DRS 20%	5.70 ± 0.78 <sup>a</sup>

Los valores (n=18) corresponden a los animales alimentados con las diferentes dietas. La tabla inserta muestra el contenido de TG en músculo esquelético (gastrocnemio) expresado como media ± SEM (n=6 en cada grupo dietario). Los valores con letras superescritas distintas son significativamente diferentes (p<0.05).

**Tabla 7. Contenido de Glucógeno y actividad Glucógeno Sintasa (GS) en músculo esquelético gastrocnemio en los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales a las 42 semanas de ingesta.**

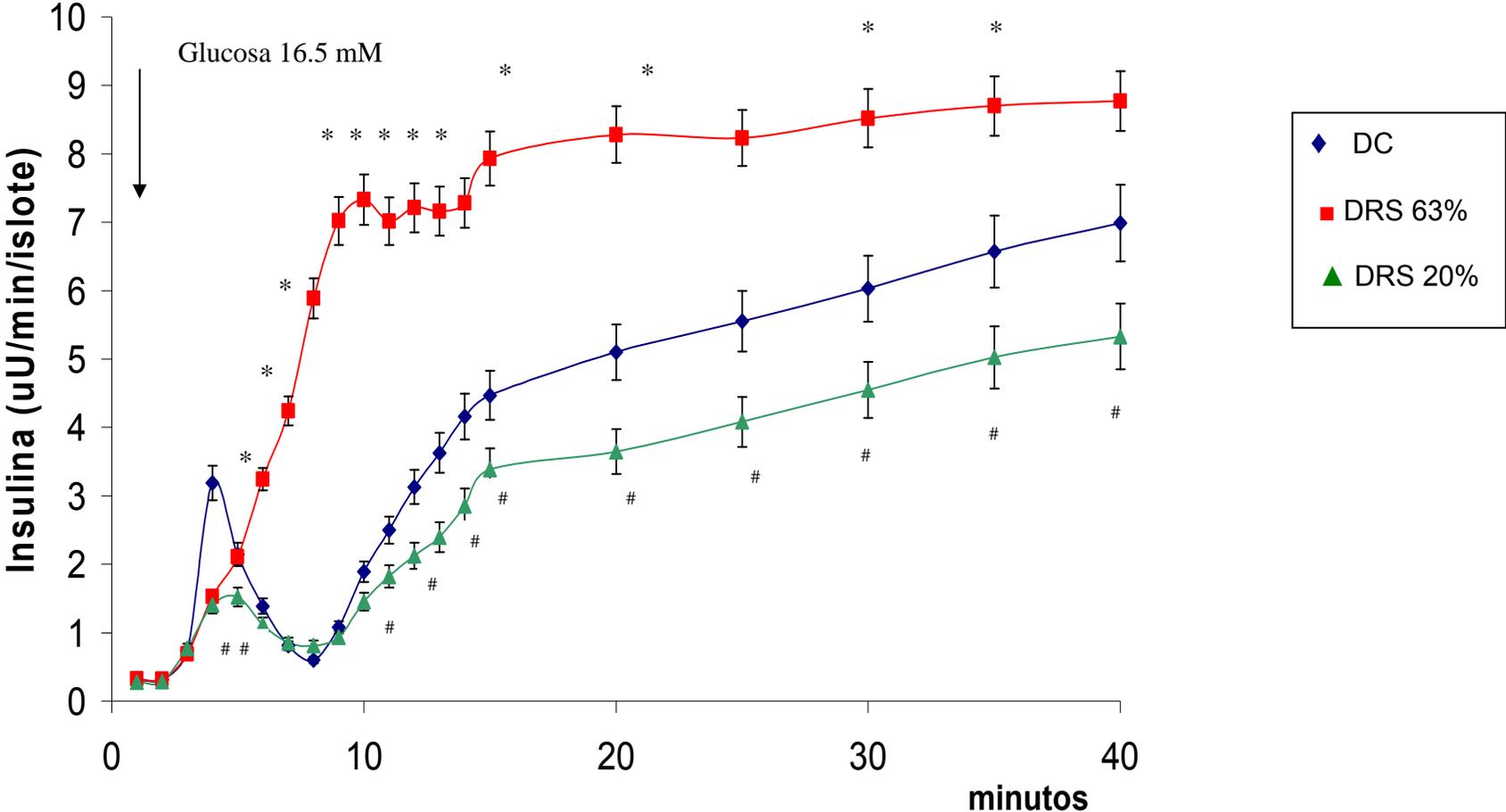
	Dietas		
	DC	DRS 63%	DRS 20%
<b>Glucógeno</b> ( $\mu\text{mol/gTH}$ )	20.10 $\pm$ 1.96 <sup>a</sup>	17.28 $\pm$ 1.72 <sup>a</sup>	20.30 $\pm$ 1.63 <sup>a</sup>
<b>GS %</b> GSa/ GS (a+b)	40.4 $\pm$ 1.80 <sup>a</sup>	39.4 $\pm$ 2.46 <sup>a</sup>	39.3 $\pm$ 2.31 <sup>a</sup>

La actividad de la GS se expresa como porcentaje de la fracción activa sobre la total. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (n=6). Los valores con letras superescritas distintas son significativamente diferentes cuando una variable fue comparada a un tiempo según el test de Newman-Keuls.

glucosa: ausencia del primer pico de secreción y una segunda fase hipersecretora. Un perfil de secreción similar se observa luego de 30 semanas de DRS (datos no mostrados). La reducción en el contenido de la sacarosa en la dieta durante 12 semanas ejerce un efecto beneficioso en la secreción de la hormona: se observa la presencia clara de un primer pico. Aunque la segunda fase de secreción es aún menor que la del grupo control **(Fig. 16)**.

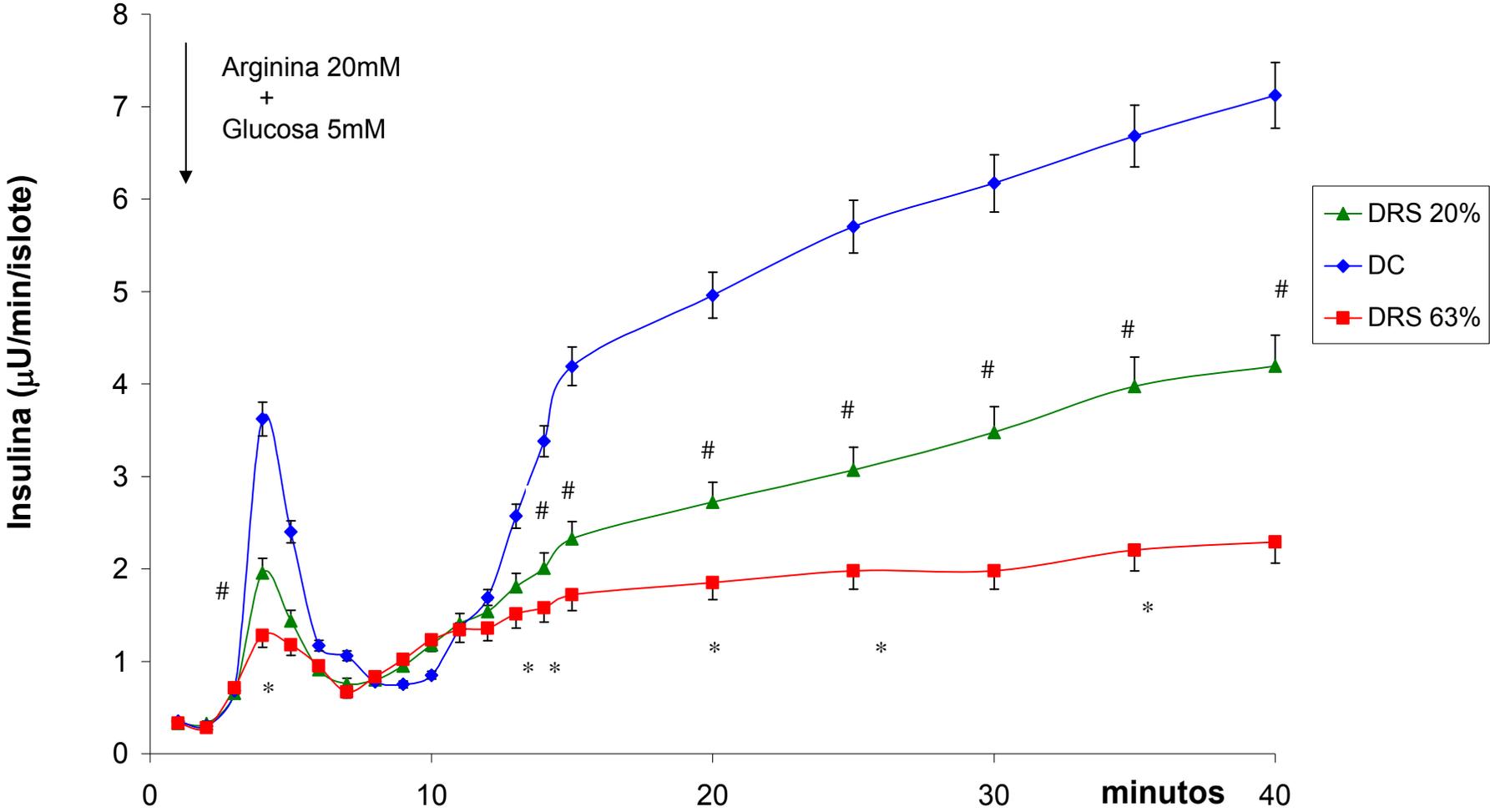
La **Figura 17** evaluó la respuesta pancreática frente a los secretagogos arginina 20mM + glucosa 5mM. El aminoácido actúa a través de una vía de estímulo diferente de la utilizada por la glucosa. Al igual que lo expuesto en el párrafo anterior el cambio de dieta mejoró significativamente el alterado patrón secretorio presente en los animales alimentados con DRS 63%.

Figura 16. Secreción de insulina en islotes pancreáticos aislados perfundidos con Glucosa 16.5 mM de los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales .



Los valores se expresan como media ± SEM (n=6), \* p< 0.05 DRS 63% vs DC; # p< 0.05 DRS 20% vs DC

**Figura 17. Secreción de insulina en islotes pancreáticos aislados perfundidos con Arginina 20 mM + Glucosa 5 mM de los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales.**



Los valores se expresan como media ± SEM (n=6), \* p< 0.05 DRS 63% vs DC; # p< 0.05 DRS 20% vs DC.

# DISCUSIÓN

## **DISCUSIÓN**

La creciente prevalencia de obesidad, dislipemia, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares entre otras alteraciones presentes en el Síndrome Plurietabólico es la consecuencia de factores genéticos y ambientales. Dentro de estos últimos, cambios en la composición de los nutrientes de la dieta tales como aumento del consumo de azúcares refinados, grasas saturadas, etc. y otros relacionados al estilo de vida tales como la inactividad física parecen jugar un rol importante (Basciano y col., 2005; Elliot y col., 2002; Volek y col., 2005).

Numerosos son los esfuerzos que se están realizando para tratar de ampliar los conocimientos de las bases científicas de dichos desórdenes metabólicos, que discapacitan a un número cada vez más elevado de personas de la población general. En las investigaciones básicas se utilizan diferentes modelos experimentales nutricionales que se asemejan, en diferentes aspectos bioquímicos-metabólicos, a los descritos en el Síndrome Plurimetabólico o X y que a pesar de sus limitaciones en la extrapolación de los resultados obtenidos al humano, resultan sumamente útiles para estos fines.

En el presente trabajo de tesis utilizamos el modelo nutricional de dislipemia e insulino-resistencia inducida por una administración crónica de dieta rica en sacarosa (DRS). Los cambios metabólicos temporales descritos anteriormente en este modelo (ítem Introducción) pueden reflejar las etapas tempranas de la diabetes mellitus tipo 2, ya que muchos pacientes presentan en forma crónica niveles plasmáticos elevados de ácidos grasos no esterificados (AGNE) y triglicéridos (TG), alterada sensibilidad insulínica periférica y pérdida del primer pico de secreción de insulina en respuesta a la glucosa.

Este estudio fue realizado en ratas alimentadas con DRS durante 42 semanas, en las cuales una dislipemia e insulino-resistencia estable está presente antes de que la fuente de sacarosa (63%) de la dieta se reduzca a 20% durante las últimas 12 semanas de ingesta.

Los hallazgos más significativos señalan:

1- La reducción del contenido de sacarosa de la dieta (63% a 20%) durante 12 semanas produce en forma secuencial un descenso de la glucemia, triglicéridos y AGNE plasmáticos, sin modificaciones de la insulinemia. Esto se acompaña de un descenso del contenido de triglicéridos hepáticos. La excesiva adiposidad visceral mejora sensiblemente.

Los cambios más pronunciados se observan luego de la administración de 12 semanas de una DRS reducida en su contenido de sacarosa.

2- a) Al cabo de 12 semanas de la reducción en el porcentaje de sacarosa dietaria la secreción "in vivo" de VLDL-TG y la remoción plasmática de triglicéridos alcanzó valores semejantes a los de animales alimentados con dieta control (almidón 63%). Estos cambios se acompañan de una marcada reducción en el peso corporal y la adiposidad (tanto la masa de tejido adiposo visceral como el contenido de grasa de la carcasa)

b) El patrón de secreción de insulina en islotes perifundidos aislados frente a diferentes secretagogos (Glucosa 16.5 mM, Arginina 20 mM + Glucosa 5 mM) mejora significativamente con respecto a lo observado en animales alimentados con DRS 63%. También se observan cambios favorables en la homeostasis de la glucosa.

Al respecto los cambios favorables puntualizados en el presente estudio son el resultado de la reducción de porcentaje de sacarosa dietaria y no pueden ser atribuidos a un cambio en la edad de los animales ya que ratas de igual sexo y edad alimentadas con dieta control no muestran cambios apreciables en los parámetros analizados a lo largo del período experimental, a excepción del peso corporal.

Como fue demostrado anteriormente por distintos autores (Reaven y col; Zavaroni y col; Lombardo y col; Vrana y col., entre otros) la magnitud de la dislipemia y la resistencia insulínica inducida por una dieta rica en carbohidratos simple (sacarosa y/o fructosa) depende de la edad del animal, el tipo y cantidad de carbohidrato y el tiempo durante el cual se suministra la

dieta. Con respecto a la edad, Lingelbach y col. (2000) estudiaron el efecto de la dieta rica en fructosa “ad libitum” en ratas Fischer 344 a los 9, 18 y 26 meses de edad, suministrada a partir de los 3 meses de vida. En coincidencia con otros autores (Blanton y col, 1998) determinaron que un indicador importante es el descenso del peso corporal que comienza a declinar significativamente hacia el final del período vital (a partir de 1 año y 10 meses aproximadamente) y se acompaña de una significativa reducción en la ingesta. Este aspecto no fue observado en ninguno de nuestros lotes experimentales.

### **Efecto de la reducción de la sacarosa dietaria sobre el peso corporal y la adiposidad visceral**

En ratas Wistar normales alimentadas “ad libitum” Newby y col (1990) ha demostrado que el tamaño del tejido adiposo blanco (epididimal y retroperitoneal) incrementa con la edad y el peso corporal contribuyendo al desarrollo de adiposidad. Nuestros datos señalan, utilizando ratas de la misma cepa, de igual sexo y edad, un incremento significativamente mayor del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal cuando las mismas son alimentadas crónicamente con DRS. Más aún y consecuentemente con lo observado por Newby y col (1990), el peso corporal de las ratas alimentadas con DRS se asoció en forma directamente proporcional al acúmulo de grasa epididimal y en forma logarítmica con el tejido adiposo retroperitoneal. Estos resultados estarían indicando que la dieta no modifica la dinámica de distribución de los triglicéridos en los distintos tejidos adiposos, al menos en lo que corresponde al depósito de la grasa visceral, y que -tanto el tejido adiposo epididimal como el retroperitoneal- continúan siendo marcadores útiles del depósito lipídico.

Varios autores han estudiado la influencia de la administración de una DRS sobre el peso corporal y los depósitos grasos, aunque estos estudios señalan que la respuesta a la sacarosa depende de la especie de roedor utilizada, de la edad del mismo y del tiempo de administración de la dieta. Así es como ratas Osborne-Mendel responden con una acumulación grasa y ganancia de peso mientras que en las ratas S 5B/PI la sacarosa induce pérdida de peso

(Schemmel y col, 1982). Las ratas hipertensas/corpulentas espontáneas ganan peso con la ingesta de sacarosa (Michaelis y col, 1984), mientras las ratas Cohen pierden peso y masa del tejido adiposo (Cohen y col, 1972) y los ratones Spiny pierden peso con dietas prolongadas ricas en sacarosa (Shafrir E, 2000). Más aún ratas Wistar y Sprague-Dowley alimentadas con dietas ricas en fructosa también muestran un incremento del peso del tejido adiposo epididimal (Blakely y col, 1982; Rizkalla y col, 1990). Un incremento del peso corporal acompañado de un mayor depósito de grasa visceral fue observado por Blazquez y Lopez-Quijada (1964) en ratas Wistar alimentadas desde el final de la lactancia y por 30 días (68% p/p). Kanarek y Orthen-Ganbill (1982) también observaron que la adición de azúcares simples (fructosa y sacarosa 32% p/v) durante 50 días al agua de bebida de ratas jóvenes adultas Sprague-Dowly conducía a un aumento del peso corporal y del tejido adiposo retroperitoneal.

La implementación de una dieta con menor contenido de sacarosa (20%) por un adecuado período de tiempo (12 semanas) condujo a un menor incremento de la adiposidad visceral y del peso corporal presentes en las ratas alimentadas crónicamente con DRS 63%.

En general los cambios en la masa del tejido adiposo pueden ser atribuidos a la diferencia entre ingesta calórica y gasto energético. Las variaciones en el aporte energético de los animales alimentados con DRS 63% o 20% podrían jugar un papel importante en los cambios observados en ambos lotes en el desarrollo de la adiposidad y en el incremento del peso corporal total. En nuestros animales la reducción del porcentaje de sacarosa de la dieta se acompaña de un menor incremento del peso corporal y de la ingesta calórica. Sin embargo no debemos descartar la posibilidad de que la sacarosa/fructosa dietaria sea capaz de producir aumento de peso aún en ausencia de incremento de ingesta calórica, como fue demostrado por Oscai y col (1987).

La composición de la carcasa puede estar también influenciada por la dieta. Suzuki y col (1975) demostraron que tanto la ingesta de una dieta rica en grasa como de una dieta rica en carbohidratos administrada durante 2 semanas conduce a un aumento del contenido graso de la carcasa en ratas

hembras normales. De acuerdo con estos resultados observamos que la ingesta prolongada de DRS condujo también a un aumento en el contenido graso de la carcasa con disminución del contenido de agua. El menor porcentaje de sacarosa en la dieta tiende a normalizar estos parámetros que se asemejan a los observados en animales con dieta control.

Por otro lado, en el presente trabajo se ha demostrado que los animales a los cuales se ha suministrado la dieta con reducido contenido de sacarosa (DRS 20%) la normalización de los niveles plasmáticos de triglicéridos provee menor cantidad de sustrato en circulación para la síntesis por el tejido adiposo y, además, la actividad de la enzima involucrada en la hidrólisis de dichos triglicéridos (lipoproteína lipasa) demostró estar significativamente disminuida en el tejido adiposo del grupo DRS 20% comparado con el grupo DRS 63%. De esta manera, puede sugerirse que estos mecanismos también estarían contribuyendo a la reducción de la masa adiposa.

Por otra parte, Roberts y cols (2001) alimentando ratas hembra Fischer “ad libitum” con una dieta semejante a la consumida en occidente -elevado contenido en grasas 39% y en sacarosa 40% de las calorías totales- durante 20 meses demostraron que la obesidad inducida por la dieta puede ser revertida parcialmente reduciendo el contenido de grasa (12% de las calorías) y administrando carbohidratos complejos (almidón 69% de las calorías totales) durante 2 meses. La ingesta calórica fue semejante entre los grupos (experimentales y control) demostrando una disminución del peso corporal y observando menor contenido de grasa en la cavidad abdominal en los animales con menor porcentaje de grasa y mayor contenido de almidón dietario. Estas últimas observaciones son similares a nuestros hallazgos en ratas donde se ha reducido la cantidad de sacarosa de la dieta al 20%.

Además trabajos recientes indican que el incremento de la adiposidad producida por la ingesta de elevadas cantidades de fructosa podría deberse a los efectos del monosacárido sobre hormonas relacionadas a la saciedad tales como insulina, leptina y ghrelina. Estas hormonas funcionan de manera clave como señales en el sistema nervioso central en la regulación a largo plazo del balance energético. Se ha propuesto que la glucosa pero no la fructosa provee señales de saciedad al cerebro dado que esta última no puede ingresar al mismo (Porte y col, 2002; Bray y cols, 2004; Wylie-Rosett y cols, 2004). En este

sentido Miller y col (2002) inyectaron fructosa en los ventrículos cerebrales de ratas y observaron que se producía un incremento en la ingesta calórica, mientras que inyectando concentraciones similares de glucosa el apetito era suprimido. En nuestro trabajo los niveles de insulina plasmática son semejantes en los tres grupos dietarios. Aunque no se evaluaron los niveles de leptina o ghrelina, no puede descartarse que el mecanismo descrito anteriormente puede estar contribuyendo a la disminución de la ingesta energética y de la adiposidad observadas en las ratas alimentadas con DRS 20%.

### **Efecto de la reducción del porcentaje de sacarosa dietario sobre el metabolismo lipídico**

El hígado juega un rol central en el metabolismo global de los carbohidratos y de los lípidos y numerosos caminos metabólicos pueden ser regulados por modificaciones en la actividad o abundancia de diferentes familias de factores de transcripción, entre ellas los receptores nucleares activadores de la proliferación nuclear (PPARs), proteínas de unión al elemento receptor de esteroides (SREBPs) y receptores nucleares hepáticos de hormonas (LXR  $\alpha$  y  $\beta$ ). Estos factores relacionados con la biosíntesis y oxidación de lípidos pueden ser regulados entre otros por cambios nutricionales (PUFA, sacarosa) y hormonales (insulina, glucagon, etc.). Al respecto Mijazaki y col (2004) demostraron una inducción de la isoforma hepática del SREBP<sub>1C</sub> y de la expresión de las enzimas lipogénicas: Sintetasa de Ácidos Grasos, Acetil CoA Carboxilasa y la Esteroil-CoA Desaturasa en ratones alimentados durante 7 días con dietas ricas en fructosa (60%). Más aún Nagai y col (2002) mostraron que en ratas normales alimentadas durante 8 semanas con una dieta rica en fructosa se modifica la expresión hepática mRNA-PPAR $\alpha$  y su actividad, así como la expresión y actividad de enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos (ej. Carnitina palmitoil transferasa-1). Iritani y col (1992) también observaron que niveles elevados de sacarosa dietarios (67% p/p) eran capaces de regular a nivel transcripcional la concentración de mRNA y la inducción de enzimas lipogénicas en hígado de rata.

Si bien en el desarrollo de esta tesis no hemos cuantificado las actividades y/o expresión génica de las enzimas involucradas en el metabolismo de los triglicéridos hepáticos, sin perjuicio de otros factores, los mecanismos antes mencionados podrían contribuir al excesivo contenido de triglicéridos en las ratas con DRS 63% y a su menor acúmulo cuando se reduce el porcentaje de sacarosa dietario.

Además una mayor disponibilidad de AGNE plasmáticos -consecuencia de una incrementada lipólisis del tejido adiposo (Soria y col, 2001)- como la observada en los animales con DRS 63% podría también -vía esterificación- contribuir sustancialmente a un mayor pool de triglicéridos hepáticos.

La reducción en el contenido de sacarosa dietaria (20%) indujo un descenso significativo en el contenido de triglicéridos hepáticos. Cambios opuestos en la expresión de los factores de transcripción PPAR $\alpha$  y SREBP $_{1C}$  que inducen modificaciones en la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos podrían explicar el descenso del pool hepático de triglicéridos consecuentes con el menor porcentaje de fructosa dietaria en este grupo experimental (10.5% de las calorías totales).

Un decrecimiento en los niveles de AGNE plasmáticos también fue observado en los animales alimentados con DRS 20%. Esto condujo a un menor flujo de ácidos grasos del tejido adiposo al hígado y a otros tejidos, contribuyendo también a una menor síntesis de triglicéridos.

EL pool de triglicéridos hepáticos es la consecuencia del balance entre la síntesis por esterificación del glicerol-3-fosfato y los ácidos grasos (sintetizados "de novo" o provenientes del plasma de una mayor lipólisis) y la secreción de VLDL-TG. En particular en una ingesta rica en sacarosa como se observa en las ratas con DRS 63% el glicerol-3-fosfato proviene principalmente de la vía de metabolización de la fructosa. En este modelo hemos constatado que el aumento de TG hepáticos se acompaña de un significativo incremento en la secreción de VLDL-TG.

La menor proporción de la sacarosa en la dieta disminuye la secreción de VLDL-TG cuyos valores se asemejan al grupo control (DC). Sin embargo en

estos animales el pool de triglicéridos hepáticos –aunque sensiblemente menor al de DRS 63%- es aún significativamente mayor al observado en las ratas controles. Diferentes factores pueden influir en el desbalance entre la secreción de VLDL-TG y el contenido de triglicéridos hepáticos en estas ratas con DRS 20%; entre ellos: una alterada disponibilidad de apo B y/o ensamblaje, la actividad de la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTP), el entorno hormonal existente (sensibilidad insulínica), etc (Taghibiglou y cols, 2000). El respecto Reaven y col (1984) señalaron que la velocidad de secreción de triglicéridos “in vitro” en presencia de ácidos grasos varía considerablemente dependiendo de los niveles pre-existentes “in vivo” de insulina plasmática. En un trabajo de revisión sobre esteatosis hepática en modelos animales y su relación con la producción de VLDL-TG, den Boer y cols (2004) coinciden con la importancia de los factores antes mencionados e indican que el incremento del flujo de ácidos grasos hacia el hígado no es el único determinante de la secreción hepática de VLDL-TG.

Los niveles de TG presentes en el plasma son el resultado de una acción combinada de la velocidad de secreción de VLDL-TG y de la remoción plasmática. En el presente estudio la hipertrigliceridemia observada en las ratas alimentadas con DRS 63% durante 42 semanas sería la consecuencia de una combinación de ambos procesos: una incrementada secreción de VLDL-TG acompañada de una defectuosa remoción de los triglicéridos plasmáticos (disminución de la velocidad fraccional de remoción de una emulsión grasa  $K_2$  %  $\text{min}^{-1}$ ).

Cuando se sustituye parcialmente la sacarosa por almidón durante las últimas 12 semanas de la experiencia, la velocidad de remoción de los triglicéridos circulantes se normaliza completamente (en concordancia con la normalización de la hipertrigliceridemia). En lo que respecta a la velocidad de clarificación de los triglicéridos plasmáticos, cabe citar que Lithell y col (1976) demostraron que la velocidad fraccional ( $K_2$  %  $\text{min}^{-1}$ ) de remoción de una partícula grasa (Intralipid) se correlaciona positivamente con el nivel de TG plasmáticos y la actividad LPL del músculo esquelético. De este modo, podemos postular que la normalización de los niveles de triglicéridos

plasmáticos en ratas alimentadas con DRS 20% son el resultado de una normalización de la secreción de VLDL-TG y de la velocidad de remoción de triglicéridos circulantes.

### **Efecto de la reducción del porcentaje de sacarosa dietaria sobre la homeostasis de la glucosa y la secreción de insulina en islotes pancreáticos perifundidos**

En el músculo esquelético la regulación del metabolismo de la glucosa involucra un juego complejo con otros combustibles energéticos, especialmente los ácidos grasos. Estudios tanto en ratas como en humanos (Ellis y col, 2000) han mostrado que el grado de resistencia insulínica se correlaciona significativamente con el contenido de triglicéridos musculares. D'Alessandro y col (2000) han demostrado recientemente en ratas alimentadas con DRS 63% p/p un incremento significativo en el contenido tanto de triglicéridos como de ácidos grasos de cadena larga unidos a CoA (LCA-CoA) en el músculo gastrocnemio. Esto se acompaña de una insensibilidad insulínica periférica global muy pronunciada y elevados niveles plasmáticos de triglicéridos y AGNE.

La importancia de los niveles de AGNE plasmáticos como sustrato clave en la regulación metabólica de la utilización de combustible por parte del músculo tanto esquelético como cardíaco se reconoce desde los inicios en los postulados de Randle en la década del '60.

El tejido adiposo es un tejido clave en la provisión de AGNE hacia otros tejidos no adiposos sensibles a la acción insulínica. Los elevados niveles de AGNE observados en este modelo podrían ejercer un efecto modulador de la acción insulínica periférica global, contribuyendo indudablemente a la resistencia insulínica. Al respecto Cooney y col (2002) observaron en modelos animales de resistencia insulínica (dieta rica en grasa, infusión de lípidos o de glucosa, etc) , la presencia de altos niveles de AGNE plasmáticos y de un incrementado contenido de triglicéridos y LCA-CoA en las células musculares. Esto conduciría a alteraciones en las señales de insulina (IRS-1, IRS-2, PI3K, etc).

Nuestro grupo (Soria y col, 2001) demostró que ratas alimentadas con DRS 63% a largo plazo presentan un significativo aumento de la lipólisis basal, lo cual se correlacionó con un elevado nivel de AGNE plasmáticos y una marcada disminución de la actividad antilipolítica de la insulina. En un trabajo posterior (Soria y col, 2002) se observó que una intervención dietaria (sustitución de la fuente grasa original –aceite de maíz- por aceite de hígado de bacalao) fue capaz de corregir el efecto inhibitorio de la sacarosa sobre la actividad antilipolítica de la insulina, reduciendo la incrementada lipólisis basal “in vitro” y normalizando los niveles de AGNE plasmáticos. Si bien en el presente trabajo no se midió la actividad antilipolítica de la insulina y la lipólisis basal en el tejido adiposo de los animales alimentados con DRS 20% es posible suponer que el cambio en el porcentaje de sacarosa en la dieta puede contribuir a mejorar este aspecto. La disminución de los niveles de AGNE plasmáticos sugieren entre otros este mecanismo. Más aún la significativa disminución de los niveles de glucemia y el contenido de triglicéridos en el músculo esquelético se correlacionaron positivamente con los niveles de AGNE plasmáticos. Además Lee y cols (1996) demostraron que cambios en el nivel de los AGNE plasmáticos también juegan un rol preponderante en la alteración del metabolismo de los carbohidratos a nivel hepático y periférico global a partir de la observación que compuestos que disminuyen los AGNE (Acipimox) incrementan la sensibilidad insulínica a ambos niveles. En este sentido, en ratas alimentadas con DRS 63% (Chicco y col, 1999) demostraron que cuando la sacarosa de la dieta es removida totalmente durante 15 semanas los niveles aumentados de TG se normalizan al cabo de 7 días mientras que los niveles de AGNE y glucosa plasmáticos necesitan al menos el doble de tiempo en retornar a los valores normales sin modificaciones en la insulinemia. Además, la velocidad fraccional de desaparición de la glucosa endovenosa (Kg) alcanzó niveles comparados al observado en los animales controles (Chicco y col 1999). Una respuesta similar fue constatada cuando la sacarosa dietaria se redujo al 20% (Fortino y col, 2006). Por lo tanto es posible sugerir que el porcentaje de azúcar simple dietario y el tiempo de suministro de la dieta son factores muy importantes para modular la homeostasis de la glucosa y los niveles de TG y AGNE plasmáticos.

A nivel pancreático la respuesta de la insulina a la glucosa depende tanto de la masa de células  $\beta$  como de su función y de los factores que influyen dicha función in vivo, tales como sistema nervioso, nutrientes y hormonas circulantes (Ahrén y Pacini, 2002; Pacini y cols, 2001). Al respecto, en trabajos previos a largo plazo utilizando ratas alimentadas con DRS 63% hemos demostrado que existe un incremento de la masa de células  $\beta$  sin incremento en el contenido de insulina pancreático que resultan insuficientes para compensar la alterada acción de la insulina (Lombardo y cols, 1996; Del Zotto, Fortino y cols, 2002).

Los lípidos ejercen un efecto complejo sobre la función de la célula  $\beta$ . Al respecto se ha propuesto que el incremento sostenido de los AGNE plasmáticos ejercen efectos deletéreos sobre la función de la célula  $\beta$  pancreática a partir de diferentes mecanismos asociados al término "lipotoxicidad" (Mc Garry y cols, 1999; Unger y cols, 1995). Por otro lado, la hiperglucemia crónica también ha demostrado ser capaz de alterar tanto la secreción como la acción de la insulina, concepto asociado al término "glucotoxicidad". Varios mecanismos podrían contribuir a la disfunción de la célula  $\beta$ , entre ellos:

- cambios en la oxidación de la glucosa
- incremento en el contenido de TG
- incremento en la síntesis de ceramida
- regulación negativa de diferentes genes (Glut2 y Glucoquinasa)
- inducción de las proteínas desacoplantes (UCP2)
- inducción de stress oxidativo
- disminución de actividad quinasa dependiente de AMP (AMPK)
- estimulación del factor de transcripción SREBP1C
- regulación de la expresión del factor de transcripción PPARs.

En este contexto nuestro grupo recientemente ha demostrado que el aumento sostenido de glucosa y AGNE en plasma de ratas alimentadas por más de 30 semanas con DRS 63% altera la secreción de insulina estimulada por glucosa "in vitro" y ejerce un efecto deletéreo sobre la función de la célula  $\beta$  pancreática. En estas condiciones observamos un patrón de secreción de insulina caracterizado por una ausencia del primer pico de secreción -fase

importante en la regulación de la producción de glucosa hepática (Pombo, 2002)- y una segunda fase hipersecretoria de la hormona bajo el estímulo de la glucosa. En estos animales se observó un incremento de TG almacenados dentro de la célula  $\beta$  y una disminuída oxidación de la glucosa -señal para la síntesis y secreción de insulina- (Pighin y col, 2003). Bajo estas condiciones la sustitución durante un período de 2 meses de la fuente grasa dietaria (aceite de maíz 8% p/p por aceite de hígado de bacalao 7% p/p + aceite de maíz 1% p/p) fue capaz de normalizar la dislipemia, los niveles de glucosa plasmáticos y normalizó el alterado patrón de secreción de insulina bajo estímulo de glucosa (Pighin y col, 2003). Similarmente nuestros resultados indican que es factible mejorar la secreción de insulina (1<sup>o</sup> y 2<sup>o</sup> fase) bajo el estímulo de glucosa cuando los animales fueron sometidos por un período de 12 semanas a una reducción en el porcentaje de sacarosa dietaria. Esta manipulación nutricional también indujo una sustancial reducción en los niveles plasmáticos de AGNE y glucosa.

Con el objeto de analizar la secreción de insulina en islotes perifundidos frente al estímulo de otros secretagogos, se analizó el efecto de la L-arginina. La acción de los aminoácidos sobre la secreción de insulina difiere marcadamente de otros nutrientes que sirven de combustible a la célula  $\beta$  – denominados iniciadores o estimulantes primarios- y dependen de la acción permisiva de la glucosa por lo cual se los denomina potenciadores o estimulantes secundarios. Así, la L-arginina se metaboliza pobremente en la célula  $\beta$  y se considera que actúa de manera diferente a cualquiera de los mecanismos de señal metabólica (tales como incremento en el almacenamiento lipídico en la célula  $\beta$  pancreática y/o disminuida actividad PDH), por despolarización de la membrana y activación de los canales de calcio dependientes del voltaje, a causa de la presencia de su carga positiva (Henquin JC, 1994). En el presente trabajo la anormal secreción de insulina bajo el estímulo de L-arginina in vitro observado en ratas alimentadas con DRS 63% mejoró sustancialmente cuando se redujo la sacarosa dietaria tendiendo al perfil mostrado por el grupo control.

Resulta interesante destacar que la mejora del alterado patrón de secreción de insulina alcanzada por el cambio de dieta se verifica de forma independiente del modo particular en que ambos nutrientes evaluados son capaces de estimular la secreción de la hormona.

De especial importancia en el análisis del patrón de secreción de insulina en animales alimentados con DRS 20% surge la recuperación y/o mejoría del primer pico. Puesto que ha sido ampliamente considerado como marcador temprano de la disfunción de la célula  $\beta$ , permite sugerir que en estos animales se ha recuperado -al menos parcialmente- la capacidad de respuesta rápida, esencial para la homeostasis de la glucosa.

# CONCLUSIÓN

## **CONCLUSIÓN**

Es una realidad bien conocida que las patologías asociadas al Síndrome Plurimetabólico representan uno de los principales problemas que aquejan a la salud mundial y también a nuestro país. Notables esfuerzos se realizan día a día para contribuir con bases científicas a la prevención de los mismos así como también a la mejoría de la calidad de vida de quienes los padecen.

El mencionado Síndrome resulta de la conjunción de factores genéticos y factores relacionados al estilo de vida (nutricionales y actividad física). Los macronutrientes de la dieta (en especial grasas e hidratos de carbono) juegan un rol muy importante en su desarrollo. Dada la posibilidad de modificar estos últimos, han sido el blanco elegido tanto para el estudio de los mecanismos implicados en la fisiopatología como para la aplicación de intervenciones que resulten beneficiosas para la salud.

El objetivo del presente trabajo enfocó específicamente con el estudio de la influencia que ejerce la sustitución isocalórica parcial de la fuente de Hidratos de Carbono de la dieta (sacarosa por almidón) sobre aspectos del metabolismo lipídico y homeostasis de la glucosa. Para ello se utilizó un modelo animal de dislipemia y resistencia insulínica logrado a través de la administración crónica de una dieta rica en azúcares refinados que presenta en muchos aspectos bioquímicos- metabólicos similitudes el Síndrome Plurimetabólico incluyendo dislipidemias y diabetes mellitus tipo 2. En este contexto, los resultados del presente estudio demuestran que la reducción del porcentaje de sacarosa dietario, en el modelo experimental utilizado, es capaz de producir una significativa disminución de los lípidos que se acompaña de cambios favorables en la homeostasis de la glucosa.

Si bien la extrapolación de los resultados obtenidos en modelos animales hacia el humano debe ser muy cuidadosa este trabajo pretende contribuir al mayor conocimiento de los mecanismos que podrían estar involucrados en la mejoría y/o reversión de alteraciones metabólicas susceptibles de modificar por la dieta. Atento a ello, consideramos que la recomendación de la reducción del consumo por parte de la población de azúcares refinados y/o la sustitución de

los mismos por azúcares complejos (almidones) puede ser muy útil no sólo para ayudar en la prevención sino también para mejorar patologías asociadas al Síndrome Plurimetabólico.

De esta manera, a partir de la investigación básica, estaría intentando abrir caminos que muestren alternativas para mejorar la calidad de vida del ser humano.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHA. (2006). *Diet and Lifestyles Recommendations: Revision 2006*. A Scientific Statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 114: 82-96
- Ahrén B y Pacini G. (2002). *Insufficient islet compensation to insulin resistance vs reduced glucose effectiveness in glucose-intolerant mice*. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: R738-E744.
- Anderson GH, Catherine N, Woodend DM and Wolever T. (2002). *Inverse association between the effect of carbohydrates on blood glucose and subsequent short-term food intake in young men*. *Am J Clin Nutr* 76: 1023-1030.
- Annil Y and Brubaker PL. (2003). *Role of Leptin in the regulation of Glucagon-Like-Peptide-1 secretion*. *Diabetes*, 52: 252-259.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K and col. (1999). *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 257: 79-83.
- ATP III. (2004). NCEP Report. *Implications of Recent Clinical Trials for the National Cholesterol Education Program. Adult Treatment Panel III Guidelines*. *Circulation*, 110: 227-239.
- Bantle J, Raats S, Thomas W, Angeliki G. (2000). *Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects*. *Am J Clin Nutr*, 72: 1128-34.
- Basciano H, Federico L, and Adeli K. (2005). *Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia*. *Nutr Metab* 2: 1-14.
- Bell KS, Schmitz-Peiffer C, Lim-Fraser M, Biden TJ, Cooney GJ and Kraegen EW. (2000). *Acute reversal of lipid-induced muscle insulin resistance is associated with rapid alteration in PKC- $\theta$  localization*. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1196-E1201.
- Bergmeyer HU. 1974. *Methods for determination of metabolites. Methods of enzymatic analysis*. 2<sup>o</sup> English edition, (Bergmeyer HU ed). New York Academic Press, 1100-2110.
- Bernal C, Basílico MZ, Gutman R, Lombardo YB. (1989). *Secretion and removal rates of very low-density lipoprotein triglycerides at the three metabolic periods of hypertriglyceridemia induced by a sucrose rich diet*. *Nutr. Rep Int*. 40: 71-83.

- Bernal C, Gutman R, Lombardo YB. *The duration of feeding on a sucrose-rich diet determines variable in Vitro effects of insulin and fructose on rat liver triglyceride metabolism.* J Nutr. Biochem, 6: 422-430.
- Bizeau ME, Pagliassotti MJ. (2005). *Hepatic adaptations to sucrose and fructose.* Metabolism 54: 1189-1201.
- Blakely SR, Hallfrish J, Reiser S. (1982) *Long term effects of moderate fructose feeding on lipogenic parameters in Wistar rats.* Nutr Rep Int 25:675-685.
- Blanton CA, Geitzen DW, Horwitz BA, Mc Donald RB Murttagh-Mark C. (1998) *Meal patterns associated with the aged related decline in food intake in the age-related decline food intake in the Fischer 344 rat.* Am J Physiol 275: R1494-R1502.
- Blazquez E and Lopez Quijada C (1964). *The effect of a high-carbohydrate diet on glucose, insulin sensitivity and plasma insulin in rats.* J Endocr, 44: 107-113.
- Boot-Handford RP, Heat H. (1981). *The effect of dietary fructose and diabetes on the rat kidney.* Br J Exp Pathol 62: 398-406.
- Bray GA, Joy Nielsen S, Popkin BM. (2004). *Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity.* Am J Clin Nutr 79: 537-543.
- Burr, IA, Stauttacher W, Balant L, Renold AE Grodsky GM. (1969). *Regulation of insulin release in perfused pancreatic tissue.* Acta Diabet Lat 6: (suppl 1):580.
- Chicco A, Gutman R, Basílico M, and Lombardo YB. (1986). *Pyruvate dehydrogenase (PDH) activity in heart, liver and adipose tissue of rats fed a sucrose-rich diet.* Nutrition Reports International 33: 465-475.
- Chicco A, Gutman R, Lombardo YB. (1990). *Biochemical abnormalities in the hearth in rats with nutritionally induced hypertriglyceridemia and insulin resistance.* Frontiers in Diabetes Research. Lessons from animal Diabetes III. Editors Shafir, Smith Gordon and Company Limited. (London). Chapter XIII: 650-655.
- Chicco A, Bernal C, Soria A, Giangrossi G, Lombardo YB. (1999). *Dietary effects of partial or total substitution of sucrose for starch on glucose and lipid metabolism in dyslipemic rats.* Nutr Res 19: 281-293.
- Chicco A, Basabe JC, Karabatas L, Ferraris N, **Fortino A**, Lombardo Y. (2000). *Troglitazone (CS-045) normalizes hypertriglyceridemia and restores the altered patterns of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipidemic rats.* Metabolism 49: 1346-1351.

- Chicco A, D'Alessandro ME, Karabatas L, Pastorale C, Basabe JC, Lombardo YB. (2003). *"Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed high sucrose diet"*. J. Nutr. 133: 127-133.
- Chunli Y, Chen Y, Cline GW, Ahang D, Zong h, Wang Y, Bergerson R and col. (2002) *Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle*. J Bio Chem 277:50230-50236.
- Cohen AM, Briller S, Shafrir E. (1972). *Effect of long-term sucrose feeding on a 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.
- Cohen AM, Teitelbaum A, Rosenman E. (1977). *Diabetes induced by high fructose diet*. Metabolism 26:17-24.
- Cohen AM. (1978). *Genetically determined response to different ingested carbohydrates in the production of diabetes*. Horm Metab Res 10:86-92.
- Commenford SR, Ferniza JB, Bizeau ME, Thresher JS, Willis WT, Pagliassotti MJ. (2002). *Diets enriched in sucrose or fat increases gluconeogenesis and G-6-Pase but not basal production in rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab 283: E545-555.
- Cooney G, Thompson A, Furler S, Ye J, Kraegen E. (2002) *Muscle Long-Chain Acyl CoA Esters and Insulin resistance*. Annals of the New York Academy of Sciences, 46: 1295-1302.
- Cunniff P (1999) Editor Official Methods of Analysis of Association of Official Agricultural Chemists (16<sup>th</sup> ed), Gaithersburg, Maryland: AOAC International.
- D'Alessandro ME, Chicco A, Karabata L, and Lombardo YB. (2000). *Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: Effect of moderate levels of dietary fish oil*. J Nutr Biochem 11: 273-280.
- D'Alessandro ME, Chicco A, and Lombardo YB. (2007). *Dietary fish oil reverses lipotoxicity, altered glucose metabolism and n PKCε translocation in heart of dyslipemic insulin resistant rats*. Metabolism (en revisión).
- Daly M. (2003). *Sugars, insulin sensitivity, and the postprandial state*. Am J Clin Nutr 78: 865S-872S.
- Del Zotto H, Gómez Dumm CL Drago S, **Fortino A**, Luna GC and Gagliardino JJ. (2002). *Mechanism involved in the β-cell mass increase induced by chronic sucrose feeding to normal rats*. Journal of Endocrinology, 174: 225-231.
- Del Zotto H, Borelli MI, Flores L, García MB, Gómez Dumm CL, Chico A, Lombardo YL and Gagliardino JJ. (2004). *Islet neogenesis: an apparent key*

*component of long-term pancreas adaptation to increased insulin demand.* Journal of Endocrinology, 183: 321-330.

- den Boer M, Voshol PJ, Havekes LM Romijn JA. (2004). *Hepatic steatosis: a mediator of the Metabolic Syndrome. Lessons from animals models.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 24: 644-649.
- Dole VP, Meinertz H. (1960). *Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues.* J Biol Chem. 235:2595-2599.
- Duncombe WB. (1963). *The colorimetric microdetermination of long-chain fatty acids.* Biochem J 88:7-10.
- Elliot SS, Keim NL, Stern JS, Teff K and Havel PJ. (2002). *Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome.* Am. J. of Clin. Nutr. 76: 911-922.
- Ellis BA, Poynten A, Lowy AJ, Furler SM, Chisholm DJ, Kraegen EW, Cooney GJ. (2000). *Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 279: E554 - E560.
- Eschwège E, Balkau B. (2001). *El síndrome metabólico y la enfermedad cardiovascular.* Actas del Simposio Internacional organizado por la Fundación Alberto J. Roemmers. Editor Dr Manuel L. Martí. Buenos Aires. Pág.91-123.
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH. (2002). *Prevalence of the Metabolic Syndrome among US Adults. Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey.* JAMA, 287: 356-359.
- Fortino MA, Lombardo YB, Chicco A. (2006). *Dyslipemia and insulin resistance. Effect of the amount of dietary sucrose.* Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. XLII Reunion Annual. Nov. 12-15, Rosario, Sta Fe, Argentina. LI-P13, p.91.
- Gagliardino JJ (2000). *An overview of Argentine contributions to diabetes in the decade of the 1990s.* Diabetes Metab Res Rev, 16: 43-70.
- Golden S, Wals PA, Katz J. (1997). *An improved procedure for the assay of glycogen synthase and phosphorylase in rat liver homogenates.* Anal. Biochem. 77: 436-445.
- Guinovart JJ, Salavert A, Massagué J, Ciudad CJ, Salsas E and Itarte E. (1979). *Glycogen Synthase: a new activity ratio assay expressing a high sensitivity to the phosphorylation state.* FEBS Letters, 106: 284-288.
- Gutman R, Basílico MZ, Mochiutti N, Chicco A, Lombardo YB. (1985). *Diazoxide prevents the development of hormonal and metabolic abnormalities present in rats fed a sucrose-rich diet.* Horm Metab Res 17:491-494.

- Gutman R, Basílico MZ, Bernal C, Chicco A, Lombardo Y. (1987). *Long-Term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose rich diet*. *Metabolism* 36: 1013-1020.
- Hallfrish J, Lazar FL, Reiser S. (1979). *Effect on feeding sucrose or starch to rats made diabetic with streptozotocin*. *J Nutr* 109:1909-1915.
- Hallfrish J. (1990). *Metabolic effects of dietary fructose*. *FASEB*, 4: 2652-2660.
- Hausberger FX. (1967) *Effect of dietary and endocrine factors on adipose tissue growth*. In: *Handbook of Physiology. Adipose Tissue*. Washington DC: Am Physio Soc, sect. 5, chap. 52, p. 519-528.
- Herbert V, Lau KS, Gottlieb CH, Bleicher S. *Coated charcoal immunoassay of insulin*. *J Clin Endocrinol Metab*, 25: 1375-1384, 1965.
- Huang YJ, Fang VS, Juan CC, Chou YC, Kwok CF, Ho LT. (1997). *Amelioration of insulin resistance and hypertension in a fructose-fed rat model with fish oil supplementation*. *Metabolism*, 46: 1252-1258.
- Huijing F. (1970). *A rapid enzymatic method for glycogen estimation in very small tissue samples*. *Clin Chem Acta*, 33:567-572.
- Igel M, Kainulainen H, Brauers A, Becker W, Herberg, Joost HG. (1996). *Long-term and rapid regulation of ob mRNA levels in adipose tissue from normal (Sprague Dawley rats) and obese (db/db mice, fa/fa rats) rodents*. *Diabetología* 39: 758-765.
- Ikeda H, Shino A, Matsuo T, Iwatsuka H and Suzuoki Z. (1981). *A new genetically obese-hyperglycemic rat (Wistar fatty)*. *Diabetes* 30: 1045-1050.
- Ismail AI, Tanzer JM, Dingle JL. (1997). *Current trends of sugar consumption in developing societies*. *Community Dentistry & Oral Epidemiology* 25: 438-443.
- Iritani N, Nishimoto N, Katsurada A, Fukuda H. (1992). *Regulation of hepatic lipogenic enzyme gene expression by diet quantity in rats fed a fat-free, high carbohydrate diet*. *J. Nutr.* 122: 28-36.
- Johnson RK, Frary C. (2001). *Choose Beverages and foods to moderate your intake of sugars: The 2000 dietary guidelines for Americans – What's all the fuss about?* *J Nutr* 131: 2766S-2771S.
- Kanarek RB and Orthen-Gambill N (1982). *Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats*. *J Nutr*, 112: 1546-1554.

- Kaku K, Province M, and Permutt MA. (1989). *Genetic analysis of obesity-induced diabetes associated with a limited capacity to synthesize insulin in C57BL/KS mice: evidence for polygenic control.* Diabetologia, 32: 636-643.
- Kobayashi K, Forte TM, Taniguchi S, Ishida BY, Oka K, and Chan L. (2000) *The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: molecular characterization and effects of Western diet feeding.* Metabolism, 49: 22-31.
- Kraegen EW and Cooney GJ. (1999). *The role of the free fatty acids in muscle insulin resistance.* En: S.M. Marshall, P.D. Home and R.A. Rizza , Editors, The Diabetes Annual/12, Elsevier Science BV, 12: 141-159.
- Lacy PE, Kostianovsky M. (1967). *Methods for the isolation of intact islet of langerhans from the rat pancreas.* Diabetes, 16:35-39.
- Landry N, Bergeron N, Archer R, Samson P, Corneau L, Bergeron J and Dériaz O. (2003) *Whole fat oxidation rate and triacylglycerol concentrations in men ad libitum high-carbohydrate or low-carbohydrate diet.* Am.J. Clin. Nutr.77: 580-586.
- Lang G, Michal G. (1974). *Metabolites: Carbohydrate metabolism in methods of enzymatic analysis.* Bergmeyer HU. The Verlag Chemie International, Deerfield Beach F.L., 1238-1242.
- Laurell S. (1966). *A method for routine determination of plasma triglyceride.* Scan J Clin Lab Invest, 18:668-672.
- Lee K.J, Park KS, Park SW. (1996). *Effect of decreasing plasma Free Fatty Acid by Acipimox on Hepatic Glucose Metabolism in Normal Rats.* Metabolism 45: 1408-1415.
- Lewis B, Boberg J, Carlson LA. (1972) *Determination of the intravenous fat tolerance test with Intralipid by nephelometry.* Atherosclerosis, 1: 83-86.
- Lingelbach LB and McDonald RB. (2000). *Description of the long-term lipogenic effects of dietary carbohydrates in male Fischer 344 rats.* J.Nutr. 130: 3077-3084.
- Lithell H. (1976). *Lipoprotein lipase activity in human skeletal muscle and adipose tissue.* Acta Univ Ups 272 1-19.
- Liu S, Willet W, Stampfer M, Hu F, Franz M, Sampson L, Hennekens C, Manson J. (2000). *A prospective study of dietary glycemic load, carbohydrate intake, and risk of coronary heart disease in US women.* Am J Clin Nutr, 71: 1455-61.
- Lombardo YB, Chicco A, Mocchiutti N, Rodi M, Nusimovich B, Gutman R. (1983). *Effects of sucrose diet on insulin secretion in vivo and in vitro, and triglyceride storage and mobilization of hearts of rats.* Horm Metab Res 15:69-76.

- Lombardo YB, Chicco A, D'Alessandro ME, Martinelli M, Soria A, Gutman R. (1996). *Dietary fish oil normalize dyslipidemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet*. *Biochim Biophys Acta* 1299: 175-182.
- Lombardo YB, Drago S, Chicco A, Fainsteein-Day R, Gutman R, Gagliardino JJ, and Gomez Dumm CL. (1996). *Long-term administration of sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas*. *Metabolism*, 45: 1527-1532.
- Malik VS, Schulze MB, Hu FB (2006). *Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review*. *Am J Clin Nutr*, 84: 274-288.
- Martin-Hidalgo A, Holm C, Belfrage P, Schotz MC and Herrera E. (1994) *Lipoprotein lipase and hormone sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy*. *Am J Physiol.*, 266 (Endocrinol. Metab. 29): 930-935.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Kawada T, Fushiki T, Nakao K. (1995). *Augmented expression of the obese gene in the adipose tissue from rats fed high-fat diet*. *Biochem Biophys Res Commun*, 216: 355-358.
- Mathé D. (1995). *Dislipidemia and Diabetes: Animal Models*. *Diabetes & Metabolism*, 21: 106-111.
- Mayes PA, Laker ME. (1986). *Effects of acute and long-term fructose administration on liver lipid metabolism*. *Prog. Biochem. Pharmacol*, 21: 33-58.
- Mc Garry J.D, Dobbins RL. *Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion*. *Diabetología* 42: 128-138, 1999.
- Meyer K, Kushi L, Jacobs D, Slavin J, Ssellers T, Folsom A. (2000) *Carbohydrates, dietary fiber, and incident type 2 diabetes in older women*. *Am J Clin Nutr*, 71: 921-930.
- Michaelis O, Ellwood K, Judge J, Schoene N Hansen C. (1984). *Effect of dietary sucrose on the SHR/N corpulent rats: a new model for insulin-independent diabetes*. *Am J Clin Nutr* 39: 612-618.
- Miller CC, Martin RJ, Whitney ML, Edwards GL. (2002). *Intracerebroventricular injection of fructose stimulates feeding in rats*. *Nutr Neurosc* 5: 359-362.
- Miyazaki M, Dobrzyn A, Man W, Chu K, Samphat H, Kim H-J Ntambi JM. (2004). *Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose mediated induction of lipogenic gene expression by stl regulatory*

*element-binding protein-1c-dependent and independent mechanisms.* The J of Biol Chem, 279: 25164-25171.

- Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa, Kikkawa R, Kashiwagi A. (2002). *Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR $\alpha$ .* Am J Physiol Endocrinol Metab 282: E1180-E1190.
- Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen BJ, Leiter EH. (1995). *Hiperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxipeptidase E mutation wich reduces enzyme activity.* Nat Genet, 10: 135-142.
- Newby FD, DiGirolamo M, Cotsonis GA Kutner MH. (1990). *Model of spontaneous obesity in aging male Wistar rats.* Am. J. Physiol. 259: R1117-R1125.
- Nilsson-Ehle P, Schotz MC. (1976). *A stable radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase.* J Lip Res 17: 536-541.
- Oakes ND, Camilleri S, Furler SM. (1997a). *The insulin sensitizer BRL 49653 reduces systemic fatty acid supply and utilization and tissue lipid availability in the rat.* Metabolism 46: 935-942.
- Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. (1997b). *Mechanism of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding.* Diabetes 46: 1768-1774.
- Oscai LB, Miller WC, Arnall DA. (1987). *Effects of dietary sugar and dietary fat on food intake and body fat content in rats.* Growth 51: 64-73.
- Otway S and Robinson D. (1967). *The use of an non-ionic detergent (Triton WR 1339) to determine rates of triglyceride entry into the circulation of the rat under different physiological conditions.* J Physiological 190:321-330.
- Pacini G, Thomaseth K, and Ahrén B. (2001). *Contribution to glucose tolerance of insulin-independent vs insulin-dependent mechanisms in mice.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab, 281: E693-E703.
- Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA and Pan DA. (1996). *Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats.* Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 271: R1319-R1326.
- Pagliassotti MJ, Kang J, Thresher JS, Sung CK, and Bizeau ME. (2002). *Elevated basal PI 3-kinase activity and reduced insulin signaling in sucrose-induced hepatic insulin resistance.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282: E170-E176.

- Pan DA, Lillioja, S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, Jenkis AB, Storlien LH. (1997). *Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action*. Diabetologia 46: 983-988.
- Parks EJ and Hellerstein MK. (2000). *Carbohydrate-induced hypertriacylglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanism*. Am J Clin Nutr 71: 412-33.
- Parks EJ. (2001). *Effect of Dietary carbohydrate on triglyceride metabolism in humans*. J of Nutr. 131: 2772S-2774S.
- Pedersen O, Kahn CR, Flier JS, Kahn BB. (1991). *High fat feeding causes insulin resistance and a marked decrease in the expression of glucose transporters (Glut 4) in fat cells of rats*. Endocrinology, 129: 771-777.
- Peyron-Caso E, Fluteau-Nadler S, Kabir M, Guerre-Millo M, Quignard-Boulangé A, Slama G, Rizkalla SW. (2002) *Regulation of glucose transport and transporter 4 (GLUT4) in muscle and adipocytes of sucrose-fed rats: effects of N-3 poly- and monounsaturated fatty acids*. Horm Metab Res, 34: 360-366.
- Phenos JC, Castillo L, Voyles B, Gutman R, Lazarus L. (1971). *Recant: decreased glucose tolerance in the rat following hypophysectomy*. Endocrinology 88: 1141-1149.
- Pighin D, Karabatas L, Rossi A, Chicco A, Basabe JC, and 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.
- Podolin DA, Gayles EC, Wei Y, Thresher JS, Pagliassotti MJ. (1998). *Menhaden oil prevents but not reverse sucrose-induced insulin resistance in rats*. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol. 274: 840-848.
- Pombo M. (2002). Tratado de Endocrinología Pediátrica. Capítulo 62: Función del páncreas endócrino. 3º Ed. Mc Graw-Hill • Interamericana. España. 3º Ed. McGraw-Hill · Interamericana. Pág. 1091-1101.
- Porte Jr D, Baskin DG, Schwartz MW. (2002). *Leptin and insulin action in the central nervous system*. Nutr Rev 60: S20-S29.
- Randle, PJ. (1998). *Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acids cycle after 35 years*. Diabetes Metab. Rev. 14:263-283.
- Reaven GM, Risser TR, Chen YDI, et al. (1979). *Characterization of a model of dietary induced hypertriglyceridemia in young, non obese rats*. J. Lipid Res 20:371-378.

- Reaven GM. (1984). Lessons From Animal Diabetes. *Diabetic hypertriglyceridemia in the rat: Animal models simulating the clinical syndromes of impaired glucose tolerance, noninsulin-dependent, and insulin dependent diabetes.* (Shafir E, Renold AE, eds). London, UK, Libbey, p531.
- Reaven GM, Mondon CE. (1988). *Effect of in vivo plasma insulin levels on the relationship between perfusate free fatty acid concentration and triglyceride secretion by perfused rat livers.* Horm Metab Res, 16: 230-232
- Reaven GM. (2002). *Metabolic Syndrome. Pathophysiology and Implications for Management of Cardiovascular Disease.* Circulation 106: 286-297.
- Reeves PG, Nielsen FH and Fahey GC. (1993). *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of AIN-76A rodent diets.* J. Nutr 123: 1939-1951.
- Rizkalla SW, Helal I, Boillot J, Fontvielle AM, Laromiguiere M, Desplanque N, Bruzzo F, Tchobroutsky G, Slama G. (1990). *Comparative effects of 10 weeks of starch, glucose, fructose in normal rats.* In: Insulin and the cell membrane. Klimes I, Howard BV and Khon CR eds. New York: Gordon & Breach. Vol. 1 p. 432-450.
- Roberts CK, Nosratola DV, Liang KH, Barnard RJ. (2001). *Reversibility of chronic experimental Syndrome X by diet modification.* Hypertension 37: 1323-1328.
- Rossi A, Lombardo YB, Lacorte J-M, Chicco A, Rouault C, Slama G, and Rizkalla S. (2005). *Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats.* Am J Physiol. Integr Comp Physiol 289: R486-R494.
- Rösner S. (1974). *Studies on an intravenous fat tolerance test: Methodological experimental and clinical experiences with Intralipid.* Acta Med Scand Suppl I, 564:1-4.
- Rousseau V, Becker DJ, Ongemba LN, Rahier J, Henquin JG, Brichard SM. (1997) *Developmental and nutritional changes of ob and PPAR gamma 2 gene expression in rat white adipose tissue.* Biochem J, 321 (Pt): 451-456.
- Russell JC and Amy RM. (1986). *Early atherosclerotic lesions in a susceptible rat model. The LA/N-corpulent rat.* Atherosclerosis, 60: 119-129.
- Saris W. (2003). *Sugars, energy metabolism, and body weight control.* Am J Clin Nutr 78: 850S-857S.
- Schemmel R, Taegue R, Bray G. (1982). *Obesity in Osborne-Mendel and S 5B/PI rats: effects of sucrose solutions, castration and treatment with*

- estradiol or insulin*. An J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 243: R347-R352.
- Schling P and Löffler G (2002). *Cross talk between adipose tissue cells: Impact on pathophysiology*. News Physiol Sci 17: 99-104.
  - Schmitz-Peiffer C, Browne CL, Oakes ND, Watkinson A, Chisholm DJ, Kraegen EW. (1997). *Alteration in the expression and cellular localization of protein kinase C isoenzymes  $\epsilon$  and  $\theta$  are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat*. Diabetes, 46: 169-178.
  - Schonfeld G and Piegler B. (1971). *Utilization of exogenous free fatty acids for the production of very low density lipoprotein triglyceride by livers of carbohydrate rats*. J of Lipid Res, 12: 614-621.
  - Schulze MB, Manson JE, Ludwig DS, Colditz GA, Stampfer MJ, Willet WC, Hu FB. (2004). *Sugar-sweetened Beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women*. JAMA 292: 927-934.
  - Sevilla L, Guma A, Enrique-Tarancon G, Mora S, Munoz P, Palacin M, Testar X, Zorzano A. (1997). *Chronic fat feeding and middle-aging reduce in an additive fashion Glut4 expression in skeletal muscle and adipose tissue*. Biochem Biophys Res Commun, 235: 89-93.
  - Shafrir E., Ziv E and Mosthaf L. (1999). *Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to  $\beta$ -cell failure in animal models*. Annals of the N.Y. Accadmy of Sciences, 892: 223-246.
  - Shafrir E. (2000). *Overnutrition in spiny mice (Acomys cahirinus):  $\beta$  cells expansion leading to rupture and overt diabetes on fat-rich diet and protective energy wasting elevation in thyroid hormone on sucrose rich diet*. Diabetes Metab Res Rev 16: 94-105.
  - Síndrome Plurimetabólico. (2001). Actas del Simposio Internacional. Fundación Alberto J. Roemmers. (Ed. Dr M.L. Martí). Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.
  - Snedecor GWP, Cochran WG. (1967) *Statistical Methods applied to experimental in agriculture and biology*. (Ames, IA). University Press Iowa State. USA.
  - Soria A, D'Alessandro ME and Lombardo YB. (2001). *Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes*. J Appl Physiol 91: 2109-2116.
  - Soria A, Chicco A, D'Alessandro ME, Rossi A, Lombardo YB. (2002). *Dietary fish oil reverse epididimal tissue adiposity, cell hypertrophy and insulin resistance in dislipemic sucrose fed rat model*. J of Nutr. Biochem 13: 209-218.

- Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, and Kraegen EW. (1986). *Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats.* Am J Physiol Endocrinol Metab 251: E576-E583.
- Storlien LH, Kraegen EW, Jenkis AB and Chisholm DJ. (1988) *Effects of sucrose vs starch diets on in vivo insulin action, thermogenesis, and obesity in rats.* Am. J. of Clin. Nutr. 47: 420-427.
- Storlien LH, Pan DA, Kriketos AD, et al. (1993). *High fat diet-induced insulin resistance.* Lessons and implications for animal studies, Ann NY Acad Sci 683:57-68.
- Suzuki H, Goshi H and Sugishawa H (1975). Effects of previous feeding of a carbohydrate or a high fat diet on changes in body weight and body composition on fasted rats. J Nutr, 105: 90-95.
- Taghibiglou C, Carpentier A, Van Iderstine SC, Che B, Ruddy D, Aiton A, Lewis GF, Adeli K. (2000). *Mechanism of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance.* J Biol Chemistry 275: 8416-8425.
- Taouis M, Dagou C, Ster C, Durand G, Pinault M, Delarue J. *N-3 Polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 282: E664-E671.
- Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AB, Khouri S, Kraegen EW. (1989). *Association between fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats.* Am J Clin Nutr 49:1155-1163.
- Thorburn AW, Crapo PA, Griver K, Wallace P, Henry RR. (1990). *Long-term effects of dietary fructose on carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus.* Metabolism 39, 1: 58-63.
- Unger RH. (1995). *Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM: genetic and clinical implications.* Diabetes 44: 863-870.
- Unger RH. (1997) How obesity causes diabetes in Zucker diabetic fatty rats? Trends Endocrinol Metab, 8:276-282.
- Volek JS and Feinman. Review. (2005). *Carbohydrate restriction improves the feature of Metabolic Syndrome may be defined by the response to carbohydrate restriction.* Nutrition & Metabolism, 2: 3-48.
- Vrana A, Fábry P. (1983). Metabolic effects of high sucrose or fructose intake. Wld Rev Nutr Diet, 42:56-101.
- Wang CF, Hegsted DM. (1949). *Normal blood volume, plasma volume and thiocyanate space in rats and their relation to body weight.* Am J Physiol, 156: 218-227.

- Wollenberger A, Ristau O, Schoffa G. (1960) *Eine einfache techik der extrem schnellen abkuhlung grober gewebsstucke*. Pflugers Arch. Ges. Physiol. 270:339-412.
- Wylie-Rosett J, Segal-Isaacson CJ, Segal-Isaacson A. (2004). *Carbohydrates and increases in obesity: Does the type of carbohydrate make a difference?* Obesity Research 12:124S-129S.
- Yamakawa T, Tanaka S, Tamura K,Isoda F, Ukawa K, Yamakura Y, Takanashi Y, Kiuchi Y, Umemura S, Ishii M and Sekihara H. (1995). *Wistar fatty rat is obese and spontaneously hypertensive*. Hypertension, 25: 145-150.
- Young JB. (1988). *Effect of experimental hyper insulinemia on symphatetic nervous system activity in the rat*. Life Sci, 43:193-200.
- Zakim D, Herman RH, and Gordon WC. (1969). *The conversion of glucose and fructose to fatty acids in the human liver*. Biochemical Medicine, 2: 427-437.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman JM. (1994). *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 372: 425-432.
- Zavaroni I, Chen YDI, Reaven GM. (1982). *Studies of the mechanisms of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat*. Metabolism 31:1077-1083.

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

## **PUBLICACIONES**

- Del Zotto H, Gomez Dumm CL, Drago S, Fortino A, Luna GC, Gagliardino JJ. (2002) “MECHANISMS INVOLVED IN THE BETA-CELL MASS INCREASED INDUCED BY CHRONIC SUCROSE FEEDING TO NORMAL RATS”. J Endocrinology ; 174 (2):225-31.
- Fortino MA, Chicco AG, Lombardo YB. (2006). “EFECTO DEL PORCENTAJE DE SACAROSA DIETARIA SOBRE LA ADIPOSIDAD Y LA DISLIPEMIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RESISTENCIA INSULÍNICA”. FABICIB, 10: 33-43.
- Fortino MA, Lombardo YB, Chicco AG. (2007). “REDUCTION OF DIETARY SUCROSE IMPROVES DYSLIPEMIA, ADIPOSITY AND INSULIN SECRETION IN AN INSULIN RESISTANT RAT MODEL”. Nutrition; 23: 489-497.

## **PRESENTACIONES A CONGRESOS Y REUNIONES**

### **CIENTÍFICAS**

- “LA SUSTITUCIÓN PARCIAL DE SACAROSA POR ALMIDÓN NORMALIZA LA HIPERTRIGLICERIDEMIA EN UNA DIETA CRÓNICA RICA EN AZÚCARES REFINADOS”. Fortino, MA; Lombardo, YB; Giangrossi, G y Chicco,A. XXIV Congreso Argentino de Química. FBCB, UNL y AQA. Santa Fe, 7 al 9 de agosto de 2002.
- “EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN PARCIAL DE SACAROSA POR ALMIDÓN EN LA DISLIPEMIA Y ANORMAL SECRESIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR DIETA RICA EN SACAROSA”. Fortino, MA; Chicco,A; Soria A.; Giangrossi, G; Lombardo, YB. II Jornadas de Bioquímica y

Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP-CONICET) y Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de La Plata. La Plata, 23 al 25 de agosto de 2003.

- “EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN PARCIAL DE SACAROSA POR ALMIDÓN EN UNA DIETA A LARGO PLAZO SOBRE ASPECTOS METABÓLICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DISLIPEMIA Y RESISTENCIA INSULÍNICA” Fortino, MA; Lombardo YB; Chicco, A. XXVII Reunión anual de CASLAN. Jornadas de Nutrición y Salud. FBCB. UNL. Santa Fe, 11 al 13 de noviembre de 2004.
- “LA REDUCCIÓN DEL PORCENTAJE DE SACAROSA DE LA DIETA MEJORA LA RESISTENCIA INSULÍNICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DISLIPEMIA NUTRICIONAL. Fortino, MA; Lombardo, YB; Chicco, A. III Encuentro Bioquímico del Litoral y IV Jornadas de Comunicaciones Técnico Científicas. Santa Fe, 16 al 18 de junio de 2005.
- “INFLUENCIA DEL CAMBIO DE DIETA SOBRE LOS LÍPIDOS Y LA UTILIZACIÓN DE LA GLUCOSA EN RATAS DISLIPÉMICAS INSULINORRESISTENTES”. Fortino, MA; Lombardo; Chicco, A. III Jornadas de Lípidos y Lipoproteínas. Bahía Blanca, 16 al 19 de agosto de 2005.
- “DYSLIPEMIA AND INSULIN RESISTANCE. EFECTO F THE AMOUNT OF DIETARY SUCROSE” Fortino M.A., Lombardo Y.B., Chicco A. XLII Reunión Annual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Rosario. Santa Fe. 12 al 15 de noviembre de 2006.