

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Departamento de Ciencias Biológicas  
Cátedra de Química Biológica

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

***"Hipertrigliceridemia y resistencia insulínica. Mecanismos involucrados en el tejido adiposo. Efectos de la sustitución del tipo de ácidos grasos dietarios"***

Tesista:

**Bioquímica Andrea Silvana Rossi**

Director de Tesis:

Dra. Yolanda Bolzón de Lombardo

Co-Director de Tesis:

Dra. Adriana G. Chicco

Año: 2006

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente tesis ha sido realizada en la cátedra de Química Biológica del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral de la ciudad de Santa Fe.

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

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

- A la Dra. Yolanda Bolzón de Lombardo y a la Dra. Adriana Chicco quienes ejercieron la dirección y codirección, respectivamente, con absoluta responsabilidad, compromiso y dedicación, orientándome día a día en el trabajo de laboratorio e interpretación de los resultados obtenidos.

- Al Ministerio de Salud de la Nación, por otorgarme la Beca Ramón Carrillo - Arturo Oñativia que me permitiera iniciarme en el trabajo de esta tesis doctoral.

- A la Universidad Nacional del Litoral que me ha permitido continuar y completar mi trabajo de tesis, a través de sus CAI + D y de la beca para realizar estudios de posgrado para docentes de la institución (2002-2006) que me fuera otorgada. A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por su apoyo en el desarrollo de este programa.

- Al Programa SECyT - ECOS que me permitió realizar una estadía como becaria en el Dpto de Diabetes, Nutrición y Metabolismo INSERM

U341, Hotel Dieu, París – Francia, para realizar trabajos de capacitación en investigación que hicieron un gran aporte en este trabajo de tesis doctoral.

- A la Fundación AJ Roemmers para las investigaciones bioquímicas argentinas y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) (PICT #05-06960/BID 1201/OC-AR y PICTO 13206-BID 1201-OC (ANPCyT y UNL), que a través de sus subsidios colaboraron para la realización de esta tesis.

- A todos mis compañeros y amigos de trabajo: tesistas, técnicos, docentes y no docentes del Departamento de Ciencias Biológicas, quienes me han brindado su apoyo en estos años de trabajo.

- A la Dra. Ma. Eugenia D´Alessandro por su amistad y ayuda inagotable.

- **A mis papás, hermanos y muy especialmente a Sebastián, por brindarme todo siempre.**

## INDICE

	<b>Página</b>
• <b>Prefacio</b> .....	1
• <b>Introducción</b> .....	4
a) Características del tejido adiposo.....	4
b) Modelos experimentales de dislipidemia, resistencia insulínica y diabetes tipo 2.....	22
• <b>Objetivos</b> .....	33
• <b>Materiales y métodos</b> .....	35
a) Animales de experimentación y dietas.....	35
b) Obtención de muestras de sangre y tejidos.....	40
c) Procedimientos experimentales.....	41
d) Análisis estadístico de los datos experimentales.....	61
• <b>Resultados experimentales</b>	
• <b>Parte I</b> .....	62
a) Peso corporal e ingesta calórica.....	63
b) Metabolitos y niveles de insulina plasmáticos.....	64
c) Peso de tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal.....	67
d) Composición de carcasa.....	67
e) Estudio de la sensibilidad insulínica periférica global.....	70
f) Aspectos morfológicos del tejido adiposo epididimal.....	75
g) Histograma de distribución de diámetros celulares.....	75
• <b>Discusión Parte I</b> .....	79
• <b>Parte II</b> .....	84
a) Actividad glucosa 6-P dehidrogenasa y enzima málica.....	85
b) Actividad acetil-CoA carboxilasa y sintetasa de ácidos grasos.....	86
c) Actividad lipoproteína lipasa.....	87
d) Lipólisis basal y estimulada por isoproterenol .....	91
f) Acción antilipolítica de la insulina.....	92
g) Captación de glucosa por el adipocito.....	95
h) Secreción de insulina por islotes pancreáticos.....	97
i) Niveles de leptina y adiponectina en plasma.....	100
j) Expresión del mRNA para el gen ob y el gen adiponectina .....	100
• <b>Discusión Parte II</b> .....	103
• <b>Conclusiones</b> .....	125
• <b>Resumen</b> .....	126
• <b>Summary</b> .....	128
• <b>Bibliografía</b> .....	130

## **TABLAS Y FIGURAS**

### ***Tablas***

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1:</b> Composición de las dietas experimentales (% en peso y % en kJ).....	37
<b>Tabla 2.</b> Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de las diferentes fuentes de grasa.....	39
<b>Tabla 3:</b> Peso corporal, ingesta calórica y ganancia de peso de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).....	65
<b>Tabla 4:</b> Parámetros plasmáticos en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) al final del periodo experimental.....	66
<b>Tabla 5:</b> Peso del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) al final del periodo experimental.....	68
<b>Tabla 6:</b> Composición de carcasa de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) al final del periodo experimental.....	69
<b>Tabla 7:</b> Peso total, volumen celular y contenido de triglicéridos de adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) al final del periodo experimental.....	77
<b>Tabla 8:</b> Niveles de leptina y adiponectina plasmáticos de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del periodo experimental.....	101

## **Figuras**

	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> Rutas metabólicas en la célula adiposa.....	10
<b>Figura 2:</b> Movilización de los ácidos grasos.....	13
<b>Figura 3:</b> Factores secretados por el adipocito.....	15
<b>Figura 4:</b> Velocidad de infusión de glucosa (VIG) en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) al final del período experimental.....	71
<b>Figura 5:</b> Histograma de distribución promedio de los diámetros de adipocitos epididimales aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB), al final del período experimental.....	78
<b>Figura 6:</b> Actividad glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH) y enzima málica (ME) en tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.....	88
<b>Figura 7:</b> Actividad acetil-CoA carboxilasa (ACC) y sintetasa de ácidos grasos (FAS) en tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.....	89
<b>Figura 8:</b> Actividad enzimática lipoproteína lipasa (LPL) en tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.....	90
<b>Figura 9:</b> Lipólisis basal y estimulada por isoproterenol (Iso) en adipocitos aislados de tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.....	93

<b>Figura 10:</b> Máxima acción antilipolítica relativa de la insulina en adipocitos aislados de tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.....	94
<b>Figura 11:</b> Captación de glucosa en adipocitos aislados de tejido epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.....	96
<b>Figura 12:</b> Secreción de insulina bajo el estímulo de glucosa en islotes pancreáticos perifundidos de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) al final del período experimental.....	98
<b>Figura 13:</b> Cuantificación de la expresión del mRNA para leptina (ob) y adiponectina (adip) en tejido adiposo blanco (epididimal + retroperitoneal) de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.....	102

## **ABREVIATURAS**

**ACC:** acetil-CoA carboxilasa  
**ACTH:** hormona corticotrófica  
**ADD1:** determinación y diferenciación adipocitaria 1  
**AFABP ó aP2:** proteína que une ácidos grasos específica para tejido adiposo  
**AMPc:** adenosina monofosfato cíclico  
**AMPc-PK:** proteína kinasa dependiente de AMPc  
**AOX:** acil-CoA oxidasa  
**apo E:** apolipoproteína E  
**Apo II:** apolipoproteína II  
**ASP:** proteína estimuladora de la acilación  
**ATP-CL:** ATP-citrato liasa  
**C/EBP:** CAAT/ proteína de aumento de unión  
**CETP:** proteína transportadora de ésteres de colesterol  
**CPT1:** carnitina palmitoil transferasa 1  
**DAGAT:** diacilglicerol acil transferasa  
**DC:** dieta control  
**DG:** dieta grasa  
**DHA:** ácido docosahexaenoico  
**DMNID:** diabetes mellitus no insulino-dependiente  
**DRS + AHB:** dieta rica en sacarosa + aceite hígado de bacalao  
**DRS:** dieta rica en sacarosa  
**EPA:** ácido eicosapentaenoico  
**FAO:** oxidasa de ácidos grasos peroxisomal  
**FAS:** sintetasa de ácidos grasos  
**FFA:** ácidos grasos libres  
**G3PAT:** glicerol 3-fosfato aciltransferasa  
**G6PDH:** glucosa-6-fosfato dehidrogenasa  
**GH:** hormona del crecimiento  
**GK:** rata Goto y Kakizaki  
**GLUT 4:** transportador de glucosa 4  
**HDLc:** lipoproteína de alta densidad-colesterol.  
**HSL:** lipasa sensible a hormona  
**IL 6:** interleuquina 6  
**IRI:** insulina inmunoreactiva  
**IRS-1 e IRS-2:** sustrato receptor de insulina 1 y 2  
**LDLc:** lipoproteína de baja densidad-colesterol  
**LPA:** ácido lisofosfatídico  
**LPAAT:** LPA aciltransferasa  
**LPL:** lipoproteína lipasa  
**MGL:** monoglicérido-lipasa  
**MSH:** hormona melanocito estimulante  
**NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
**NO:** óxido nítrico  
**PAI-1:** inhibidor del activador de plasminógeno -1  
**PDE:** fosfodiesterasa



**PDH:** piruvato dehidrogenasa  
**PEPCK:** fosfoenolpiruvato carboxikinasa  
**PI3K:** fosfatidilinositol 3-kinasa  
**PKC Y PKA:** proteínas quinasas C y A  
**PPAR:** receptores nucleares activadores de la proliferación peroxisomal  
**Q:** quilomicrones  
**SIMS:** síndrome metabólico de inflamación sistémica  
**SREBP:** proteína de unión al elemento receptor de esteroides  
**STZ:** streptozotocina  
**TGF- $\beta$ :** transforming growth factor- $\beta$   
**TSH:** hormona estimulante de la tiroides  
**TZD:** thiazolidinediones  
**UCP-1:** proteína desacoplante 1  
**VIG:** índice de infusión de glucosa  
**VLDL:** lipoproteína de muy baja densidad  
**VLDL:** lipoproteína de muy baja densidad  
**ZDF:** rata Zucker diabética y obesa



## PREFACIO

La coexistencia de múltiples desórdenes metabólicos, tales como dislipidemia, hipertensión arterial, hiperinsulinemia, diabetes tipo II y obesidad, ha sido denominada Síndrome Plurimetabólico o Síndrome X. Existen también otras denominaciones para este conjunto de patologías como Síndrome metabólico múltiple ó Síndrome metabólico de inflamación sistémica (SIMS) por la reciente asociación entre los componentes del Síndrome y un incremento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Das, 2002).

De acuerdo a estudios de la Organización Mundial de la Salud, la Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente (DMNID) tipo 2, enfermedad generalmente asociada a obesidad y sedentarismo, es hoy un problema mayor de salud pública ya que afecta a millones de personas alrededor del mundo. En nuestro país existe un 6% de prevalencia, porcentaje que duplica al de hace 10 años (Gagliardino y col, 1993).

La resistencia a la acción de la insulina (resistencia insulínica) por parte de los tejidos sensibles a ella (por ejemplo: hígado, músculo y tejido adiposo), es una anomalía común del Síndrome X.

Los factores genéticos, nutricionales y metabólicos que contribuyen al desarrollo de la resistencia insulínica y disfunción de la célula  $\beta$ , así como la secuencia precisa de eventos que conducen a la aparición de la diabetes tipo 2 no están aún completamente dilucidados representando en la actualidad un problema aún no resuelto desde el punto de vista de su patogenicidad y consecuentemente de su prevención y tratamiento (Zimmet y col, 2001) (Reaven, 2000).

En este contexto el tejido adiposo es hoy reconocido por diferentes autores como un tejido clave en la resistencia insulínica y por ende en el Síndrome X relacionado a ella (Arner, 2003).



La función tradicional del tejido adiposo es la de depósito de energía en forma de triglicéridos a través de la reesterificación o síntesis “de novo” ácidos grasos, siendo además el principal proveedor de ácidos grasos a la circulación para hacer frente a la demanda de combustible energético por otros tejidos en situaciones tales como ayuno o ejercicio prolongado, a través de la lipólisis de los triglicéridos de depósito en dicho tejido.

El tejido adiposo es además reconocido como un importante órgano secretor, liberando a la circulación péptidos semejantes a hormonas (peptides like hormone) que afectan al metabolismo sistémico (sensibilidad insulínica, homeostasis energética, etc) y a la propia célula adiposa, incluyendo entre otros, a la leptina, adiponectina, TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ), etc. Ambas funciones convierten al tejido adiposo en un tejido clave para esclarecer algunos aspectos y/o mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de dislipidemias, resistencia insulínica y Diabetes tipo 2 presentes en el síndrome metabólico.

Sin embargo, la contribución de los ácidos grasos a la resistencia insulínica parece depender de su naturaleza: la ingesta de una fuente de grasas rica en ácidos grasos monoinsaturados favorecen la resistencia insulínica, mientras que los ácidos grasos polinosaturados (por ejemplo los ácidos grasos n-3 de origen marino) ejercerían un efecto protector. Las modificaciones de la fuente de grasa dietaria se reflejan en el tipo de ácidos grasos presente en la célula adiposa. Estos últimos, de acuerdo a su grado de insaturación y longitud de cadena, pueden ejercer un rol muy importante como componentes de las membranas plasmáticas así como en su interacción con los receptores nucleares activadores de proliferación peroxisomal (PPAR).

Experimentalmente es posible inducir un estado metabólico similar al descrito en el Síndrome X por manipulación dietaria (dietas ricas en azúcares refinados, sacarosa y fructosa) y sedentarismo. Al respecto, numerosos investigadores incluyendo nuestro grupo de trabajo, han



demostrado que ratas normales alimentadas crónicamente con una dieta rica en sacarosa (DRS), desarrollan dislipidemia (aumento ácidos grasos y de triglicéridos), intolerancia a la glucosa, resistencia insulínica, hiperglucemia, hipertensión arterial, moderado sobrepeso y adiposidad visceral (Lombardo y col, 1996a) (Schonfeld y Pflieger, 1971) (Blakely y col, 1982) (Reaven y col, 1979).

Un elevado y sostenido incremento de ácidos grasos plasmáticos podría ejercer un importante efecto modulador de la acción de la insulina. En este modelo, la mayor disponibilidad de ácidos grasos plasmáticos favorecería la transferencia de los mismos a tejidos “no adiposos” (hígado, músculo esquelético, páncreas, etc), que en presencia de hiperglucemia, jugarían un rol importante en los mecanismos denominados de “glucolipototoxicidad” (Prentki y col, 2002).

Utilizando este modelo nutricional experimental y dado el importante rol metabólico y funcional del tejido adiposo sobre los lípidos plasmáticos, la homeostasis de la glucosa y la resistencia insulínica, los objetivos generales del presente trabajo de tesis son:

- a) Analizar algunos mecanismos que relacionen cambios morfológicos, funcionales y moleculares del tejido adiposo en el modelo experimental de dislipidemia y resistencia insulínica inducido por la administración prolongada de DRS,
- b) Determinar de que manera estos cambios contribuyen a la hiperglucemia, resistencia insulínica y dislipidemia, y
- c) Analizar si una sustitución parcial en el tipo de ácidos grasos de la dieta (aceite de maíz –rico en ácidos grasos n-6- por aceite de hígado de bacalao - rico en ácidos grasos n-3) contribuye a mejorar y/o revertir estas anormalidades metabólicas.



## INTRODUCCIÓN

### **Características del tejido adiposo**

La estrecha relación entre adiposidad y resistencia insulínica (Frayn, 2001), señala la fundamental importancia de conocer los mecanismos de regulación de la masa grasa. Entre estos, la formación del tejido adiposo blanco a través de la diferenciación adipocitaria, el equilibrio entre las funciones de acumulación y de movilización de los lípidos en el adipocito, la secreción de numerosos factores con actividad de hormonas tales como la leptina (capaz de informar al organismo sobre la cantidad de lípidos acumulados en el tejido adiposo), adiponectina, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), etc, por mencionar sólo algunos, constituyen mecanismos claves en el desarrollo del tejido adiposo.

### **Metabolismo normal del tejido adiposo:**

#### **1. Formación y diferenciación del adipocito:**

El adipocito es una célula altamente diferenciada y especializada. La diferenciación adipocitaria ó adipogénesis es un proceso secuencial.

La primera etapa, donde el adipoblasto (célula no diferenciada) se convierte en preadipocito, se caracteriza por la activación transcripcional de genes, entre los cuales están los factores de transcripción C/EBP (CAAT/proteína de aumento de unión)  $\beta$  y  $\delta$  y el PPAR $\delta$ . Las células adquieren las funciones y la morfología definitiva de la célula adiposa. Numerosos factores de transcripción tales como el PPAR $\gamma$ , C/EPB $\alpha$  y ADD1 (determinación y diferenciación adipocitaria 1) son expresados al inicio de esta etapa terminal. Se ha identificado al PPAR $\gamma$  como el regulador principal de la adipogénesis (Walczak y Tontonoz, 2002) (Grimaldi, 2001) (Barak y col, 1999) (Rosen y col, 1999) (Tontonoz y col, 1994), y se conocen dos isoformas del PPAR $\gamma$ ,  $\gamma$ 1 y  $\gamma$ 2, siendo la forma predominante en tejido adiposo de roedores la  $\gamma$ 2 mientras



que la isoforma  $\gamma 1$  es la más importante en tejido adiposo humano (Ferré, 2004).

El control de ésta etapa de diferenciación terminal es realizado por la insulina, la hormona de crecimiento, las hormonas tiroideas, los glucocorticoides, prostaglandinas y ácidos grasos de cadena larga, entre otros. La acción de estos factores adipogénicos se realiza a nivel intracelular a través de la activación de proteínas kinasas C (PKC) y A (PKA), la movilización de calcio y la acumulación de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (Ailhaud y col, 1992) (MacDouglas y Lane, 1995).

## **2. Homeostasis energética y metabolismo del adipocito:**

El adipocito tiene la capacidad de almacenar energía bajo la forma de lípidos neutros. Durante el período postprandial, se deposita energía en forma de triglicéridos (principalmente por reesterificación de ácidos grasos captados de la circulación, ya que la síntesis “de novo” juega un rol menor en el depósito de grasa en el tejido adiposo (Shrago y Spennetta, 1976). Por el contrario, durante el ayuno, un incremento de la lipólisis favorece la liberación de los ácidos grasos de los depósitos de triglicéridos al plasma y permite la utilización de los mismos por los tejidos no adiposos (ej: músculo esquelético, hígado, etc).

### **2.1 Almacenamiento de ácidos grasos en el tejido adiposo**

#### **2.1.1 Entrada de los ácidos grasos en el adipocito**

Los triglicéridos originarios de la dieta (exógenos) ingresan a la circulación plasmática desde la linfa en la forma de quilomicrones (Q), lipoproteínas que se originan en las células de la mucosa del intestino durante el proceso de absorción. Por su parte, el hígado sintetiza y secreta otra lipoproteína, la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), la cual constituye el vehículo de transporte de los triglicéridos endógeno sintetizados desde el hígado hasta los tejidos extrahepáticos (Jump y Clarke, 1999).



La captación por parte del tejido adiposo y otros tejidos periféricos (músculo esquelético, corazón, etc) de los triglicéridos a partir de las lipoproteínas Q y VLDL está catalizada por la enzima lipoproteína lipasa (LPL). Esta enzima es sintetizada por el adipocito y actúa en el endotelio de los capilares. Así, las lipoproteínas ricas en triglicéridos que ingresan en la microcirculación se unen a la enzima por la cual tienen gran afinidad, debido a la presencia de apolipoproteína CII (apo CII) como parte integral de estas lipoproteínas. La apo CII juega un rol importante en el metabolismo de lípidos plasmáticos incrementando la afinidad de la enzima LPL por las partículas lipídicas (Olivecrona y Beisiegel, 1997).

Los triglicéridos contenidos en las lipoproteínas son sometidos así a una hidrólisis progresiva hasta ácidos grasos libre y glicerol. Los ácidos grasos son captados por la célula adiposa principalmente para reesterificarse y almacenarse como triglicéridos, mientras que el glicerol es captado principalmente por las células hepáticas (Best y Taylor, 1991).

La LPL está regulada tanto a nivel hormonal como nutricional: los glucocorticoides estimulan la expresión del gen de la LPL (Fried y col, 1993) en tanto que la insulina (y la glucosa) inducen la transcripción del gen y la glicosilación y dimerización de la enzima, necesarias para su maduración (Raynolds y col, 1990) (Semenkovich y col, 1989). El AMPc disminuye la expresión de la LPL a nivel transcripcional (Raynolds y col, 1990). A nivel nutricional, el ayuno disminuye la actividad de la enzima en el tejido adiposo mientras que estimula su actividad en otros tejidos, como el músculo esquelético y cardíaco, de manera de redirigir preferentemente los triglicéridos hacia los tejidos que necesitan ácidos grasos como sustratos energéticos. Al contrario, en el estado postprandial, la actividad de la LPL en el tejido adiposo es estimulada por la insulina y así el mecanismo se invierte y los ácidos grasos, producto de la hidrólisis de los triglicéridos de las lipoproteínas, tienden preferentemente a reesterificarse y a depositarse como triglicéridos en el tejido adiposo (Doolittle y col, 1990).



La hidrólisis de los triglicéridos plasmáticos permite que los ácidos grasos sean captados por la célula adiposa y transportados en el interior de la misma por la proteína que une ácidos grasos específica para tejido adiposo (AFABP). Esta proteína de bajo peso molecular, también llamada aP2, se halla en abundante cantidad en el citoplasma celular y es expresada durante la diferenciación adipocitaria, llegando a representar el 6% de las proteínas citoplasmáticas en la célula madura. Se ha propuesto que esta proteína estaría involucrada en el tránsito intracelular y en el metabolismo de los ácidos grasos, llevándolos por el citosol acuoso hacia la membrana de la organela intracelular involucrada en la síntesis de triglicéridos (Retículo Endoplasmático Liso) o en la oxidación de los ácidos grasos (mitocondria). Los fosfolípidos de la membrana de la organela interaccionan con los residuos básicos de la aP2, y así los ácidos grasos quedan disponibles para su utilización metabólica (Frühbeck y col, 2001) (Shaughnessy y col, 2000).

### **2.1.2 Lipogénesis**

La lipogénesis es la vía metabólica que permite la síntesis de novo ácidos grasos a partir de acetil-CoA. Los sitios principales donde se realiza lipogénesis son el hígado, tejido adiposo y glándula mamaria.

En tejido adiposo, la glucosa es transportada al interior de la célula por el transportador de glucosa GLUT4. En este tejido, el transporte de glucosa tiene la particularidad de estar estimulado por la insulina. La hormona, a través de la unión a su receptor de membrana, genera una señal que desencadena el movimiento de las vesículas que contienen los transportadores GLUT4 desde el citosol hacia la membrana plasmática para permitir la entrada de la glucosa a la célula. Una vez en el citoplasma, la glucosa es metabolizada hasta piruvato, con producción concomitante de adenosina trifosfato (ATP). El piruvato ingresa en la mitocondria y por decarboxilación oxidativa irreversible (a través del complejo enzimático piruvato dehidrogenasa – PDH) se transforma en acetil-CoA. Este se condensa con el oxalacetato generando citrato, el cual es transferido al





citosol donde es desdoblado a oxalacetato y acetil-CoA (paso catalizado por la enzima ATP-citrato liasa). El acetil-CoA es transformado a malonil-CoA por carboxilación irreversible catalizada por la acetil CoA carboxilasa (ACC). Luego, el malonil-CoA es elongado por el complejo de la sintetasa de ácidos grasos (FAS) hacia acil-CoA. La **Figura 1** representa las secuencias metabólicas anteriormente descritas. Un aumento en la producción de malonil-CoA, inhibe la oxidación de ácidos grasos a través de su interacción alostérica con la CPT-1 (carnitina palmitoil transferasa-1) e incrementa el flujo de ácidos grasos hacia la esterificación (Prentki y col, 2002).

Una de las enzimas clave en la regulación de la lipogénesis es la ACC, la cual está regulada por modificaciones alostéricas o covalentes. El citrato induce el pasaje de la forma monomérica de la enzima a la forma polimérica y activa de la ACC (Volpe y Vagelos, 1976) (Beatty y Lane, 1983). Esta enzima está igualmente regulada por factores tales como el ayuno, que disminuye su actividad al disminuir su síntesis y aumentar la velocidad de degradación de la enzima (Majerus y col, 1969) (Nakanishi y Numa, 1970). Es regulada negativamente por el glucagón (Brownsey y Denton, 1982) (Witters y col, 1988), la adrenalina y el AMPc y en forma positiva por la insulina (Brownsey y col, 1979) (Holland y col, 1985). La regulación de la actividad de la FAS, otra enzima clave de este proceso de síntesis, es pretraduccional, ya que el AMPc y el glucagón disminuyen su síntesis y la insulina aumenta la transcripción de su gen (Moustaid y Sul, 1991) (Volpe y Marasa, 1975).

La célula utiliza nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) en muchos de sus procesos de síntesis reductivas. Por lo tanto, la magnitud de la lipogénesis depende no solo del aporte de sustratos lipogénicos sino también del aporte de los equivalentes reducidos NADPH. Las principales fuentes de NADPH para estas reacciones anabólicas, son la vía de las pentosas fosfato (a través de la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa – G6PDH,



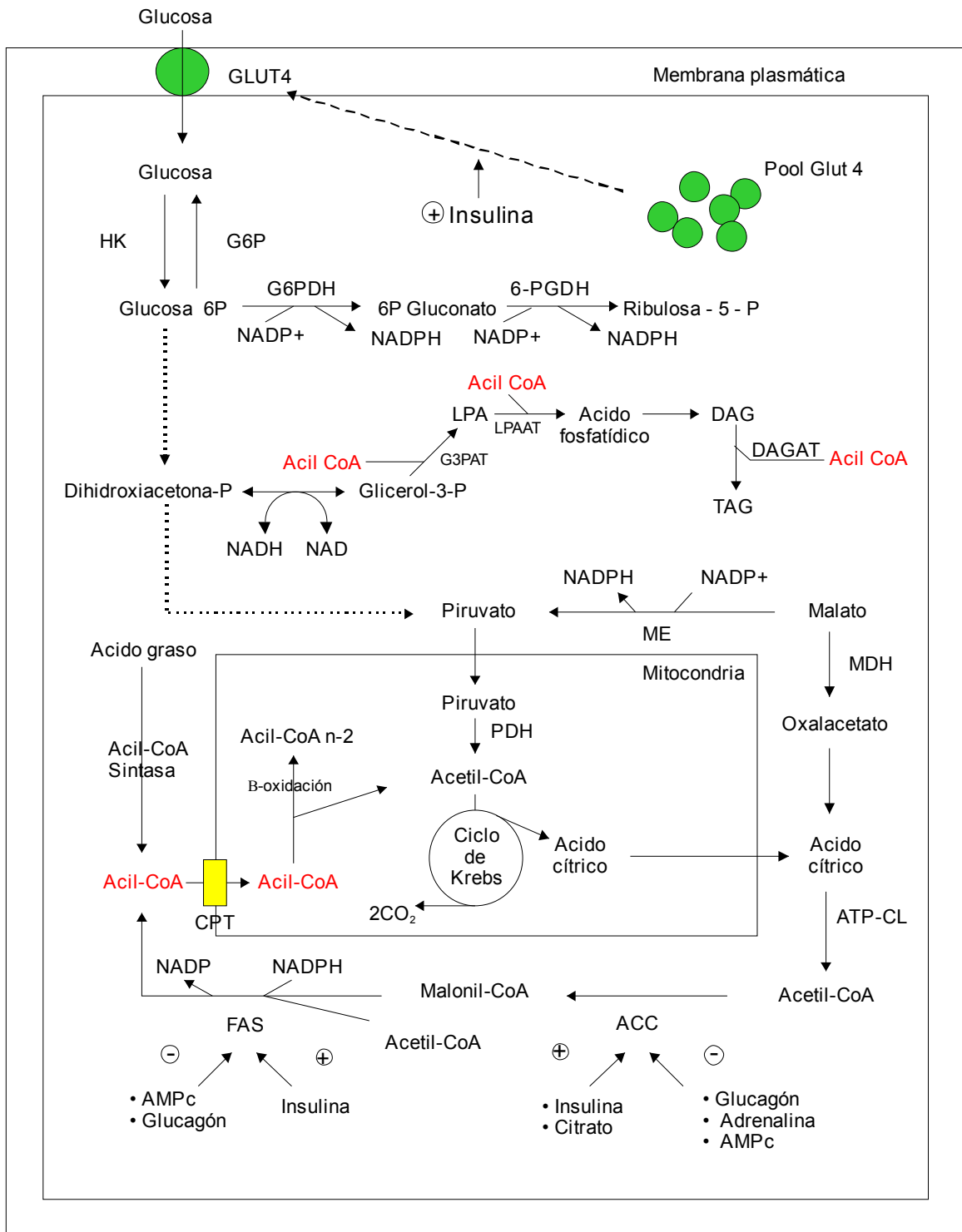
enzima clave que regula la vía) y la reacción catalizada por la enzima málica (ME) que transforma el malato en piruvato (Wise y Ball, 1964).

Una vez sintetizados los acil-CoA, estos pueden seguir diferentes rutas metabólicas, siendo su destino habitual la esterificación a acilgliceroles.

### 2.1.3 Síntesis de Triglicéridos

Los triglicéridos son sintetizados a partir de acil-CoA y glicerol-3-fosfato. La baja actividad de la enzima gliceroquinasa en el tejido adiposo determina que la provisión de glicerol-3-fosfato necesaria para este camino metabólico dependa de la captación y posterior metabolización de la glucosa (Raclot y Oudart, 2000), la cual aporta carbonos para la formación de glicerol-3-fosfato. Además, la glucosa proporciona energía en forma de ATP generado a partir de su propia degradación, que puede ser utilizada para esta vía anabólica.

La vía de síntesis de triglicéridos comienza con la acilación del glicerol-3-P en posición *sn*-1 por la glicerol 3-fosfato aciltransferasa (G3PAT) para formar ácido lisofosfatídico (LPA). La enzima LPA aciltransferasa (LPAAT) incorpora un acil-CoA en la posición *sn*-2 para formar ácido fosfatídico, el cual se hidroliza en diacilglicerol, precursor en la síntesis de fosfolípidos y triglicéridos. La diacilglicerol acil transferasa (DAGAT) es la enzima clave que controla este proceso, catalizando el último paso en la síntesis “de novo” de triglicéridos a partir de diacilglicerol y acil-CoA (Igal y col, 2001) (Yu y col, 2002) (**Figura 1**). La síntesis de triglicéridos está controlada primariamente por la cantidad de ácidos grasos disponibles mientras que la síntesis de fosfolípidos está estrechamente regulada de acuerdo con los requerimientos de recambio de membranas y proliferación celular (Igal y col, 2001).



**Figura 1:** *Rutas metabólicas en la célula adiposa.*

LPA: ácido lisofosfatídico, LPAAT: ácido lisofosfatídico aciltransferasa, G3PAT: glicerol 3P aciltransferasa, MDH: malato dehidrogenasa, HK: hexoquinasa, G3P: Glicerol 3 fosfato, DAGAT: diacilglicerol aciltransferasa, G6PDH: Glucosa 6 Fosfato dehidrogenasa, 6PGDH: 6 fosfogluconato dehidrogenasa, ME: enzima málica, PDH: piruvato dehidrogenasa, CPT: carnitina palmitoil transferasa, FAS: sintetasa de ácidos grasos, ACC: acetil CoA carboxilasa, ATP-CL: ATP citrato liasa, G6P: glucosa 6 fosfatasa, DAG: diacilglicerol, TAG: triacilglicerol.



## 2.2 Movilización de los ácidos grasos

La liberación de los ácidos grasos desde los triglicéridos almacenados en el adipocito hacia la circulación para ser utilizados como combustible celular durante el ayuno o ejercicio, es catalizada por la lipasa sensible a hormonas (HSL). La activación de esta enzima, paso limitante de la vía lipolítica, se realiza vía una cascada de señales celulares y está sujeta a un control exhaustivo realizado por hormonas y neurotransmisores que modulan la concentración intracelular de AMPc (Langin y col, 1996).

La primera acción de los reguladores endocrinos y/o parácrinos de la lipólisis es su unión al receptor de membrana. El control de la función de la célula grasa involucra varios subtipos diferentes de adrenorreceptores ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\alpha_2$ ). Los receptores adrenérgicos que activan la adenilato ciclasa ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) para generar AMPc coexisten en la misma célula grasa con los que la inhiben ( $\alpha_2$  adrenorreceptor) (Lafontan y Berlan, 1995).

La activación de los  $\beta$  receptores lleva a la generación de AMPc por estimulación de la enzima adenilato ciclasa de membrana. Esta vía está mediada por la proteína Gs, la cual está positivamente ligada a la enzima. Una elevación del AMPc intracelular lleva a la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (AMPc-PK) la cual media, a través de fosforilaciones, la activación de la HSL. Al contrario, la estimulación del receptor  $\alpha_2$  promueve la inhibición de la adenilato ciclasa vía la proteína Gi, reduce el contenido intracelular de AMPc y por consiguiente inhibe la lipólisis (Lafontan y Berlan, 1995).

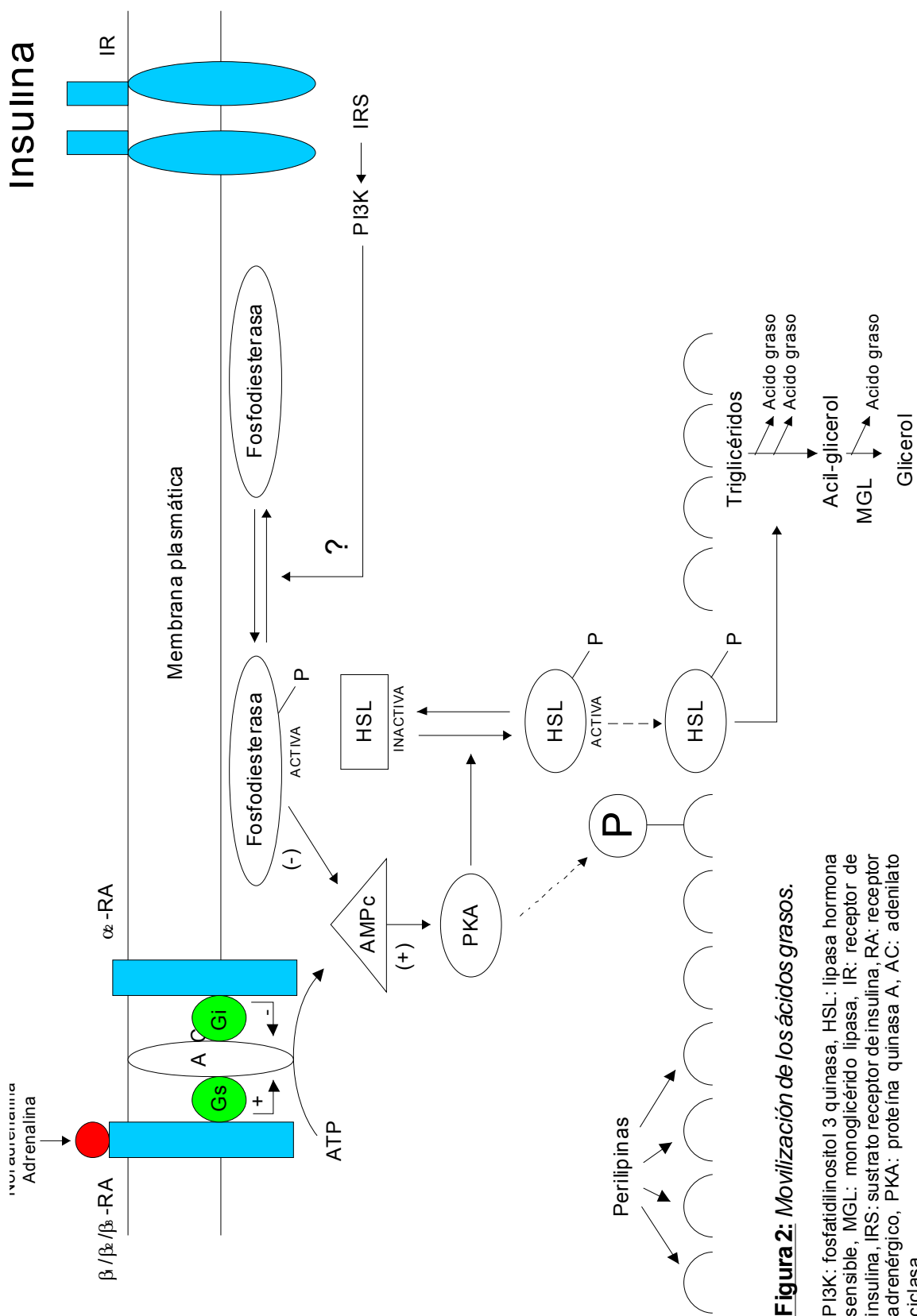
La HSL fosforilada se mueve desde el citosol hacia la superficie de la gota grasa de la célula adiposa. La fosforilación de la familia de proteínas localizadas en la superficie de la gota grasa, las perilipinas, es también requerida antes de que la HSL pueda catalizar la hidrólisis de los triglicéridos. Las perilipinas no fosforiladas crean una barrera entre la HSL y los lípidos, previniendo la lipólisis, mientras que la fosforilación de las



perilipinas por la proteína kinasa A (PKA) permite a la HSL acceder a la superficie de la gota grasa. La acción de la HSL sobre el triglicéridos presenta especificidad por los ésteres unidos en posición 1 y 3 (Yeaman, 1990). Así, produce dos moles de ácido graso y un mol de monoglicérido. La hidrólisis de este monoglicérido remanente para dar un glicerol y un ácido graso, ocurre por la acción de la monoglicérido-lipasa (MGL), que no se encuentra bajo control hormonal y cuya abundancia en la célula es suficiente para evitar la acumulación de productos intermediarios de la lipólisis (Horowitz, 2003). La **Figura 2** representa los cambios metabólicos antes descriptos.

Un único residuo de serina es fosforilado por la proteína kinasa dependiente de AMPc (AMPc-PK): el sitio 1 o sitio regulador. La fosforilación reversible del sitio 1 controla el estado activo de la enzima. Por otra parte, otro residuo de serina puede ser fosforilado: el sitio 2 o sitio basal. Esta fosforilación puede ser realizada “in vitro” por tres proteínas kinasas: proteína kinasa  $Ca^{++}$ /calmodulina-dependiente, glucógeno sintasa kinasa-4 y proteína kinasa activada por 5'AMP. La fosforilación de este residuo no altera directamente la actividad de la HSL pero sí ejerce un rol regulatorio ya que la fosforilación del sitio 1 y 2 de la HSL no se dan en simultáneo. Esto significa que por ejemplo, si el sitio 2 es fosforilado, entonces el sitio 1 está inaccesible a la AMPc-PK y por lo tanto no se produce la lipólisis. Este mecanismo claramente tiene el potencial de actuar como mecanismo antilipolítico “in vivo” (Langin y col, 1996).

Son numerosas las hormonas que aumentan la velocidad de lipólisis de los depósitos de triglicéridos: adrenalina, noradrenalina, glucagón, hormona corticotrófica (ACTH), hormona melanocito estimulante (MSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona de crecimiento (GH) y vasopresina. La insulina es la única hormona que antagoniza con la acción de las hormonas lipolíticas. Esto se debe en parte a la estimulación de la



**Figura 2: Movilización de los ácidos grasos.**

PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa, HSL: lipasa hormona sensible, MGL: monoglicérido lipasa, IR: receptor de insulina, IRS: sustrato receptor de insulina, RA: receptor adrenérgico, PKA: proteína quinasa A, AC: adenilato ciclasa.

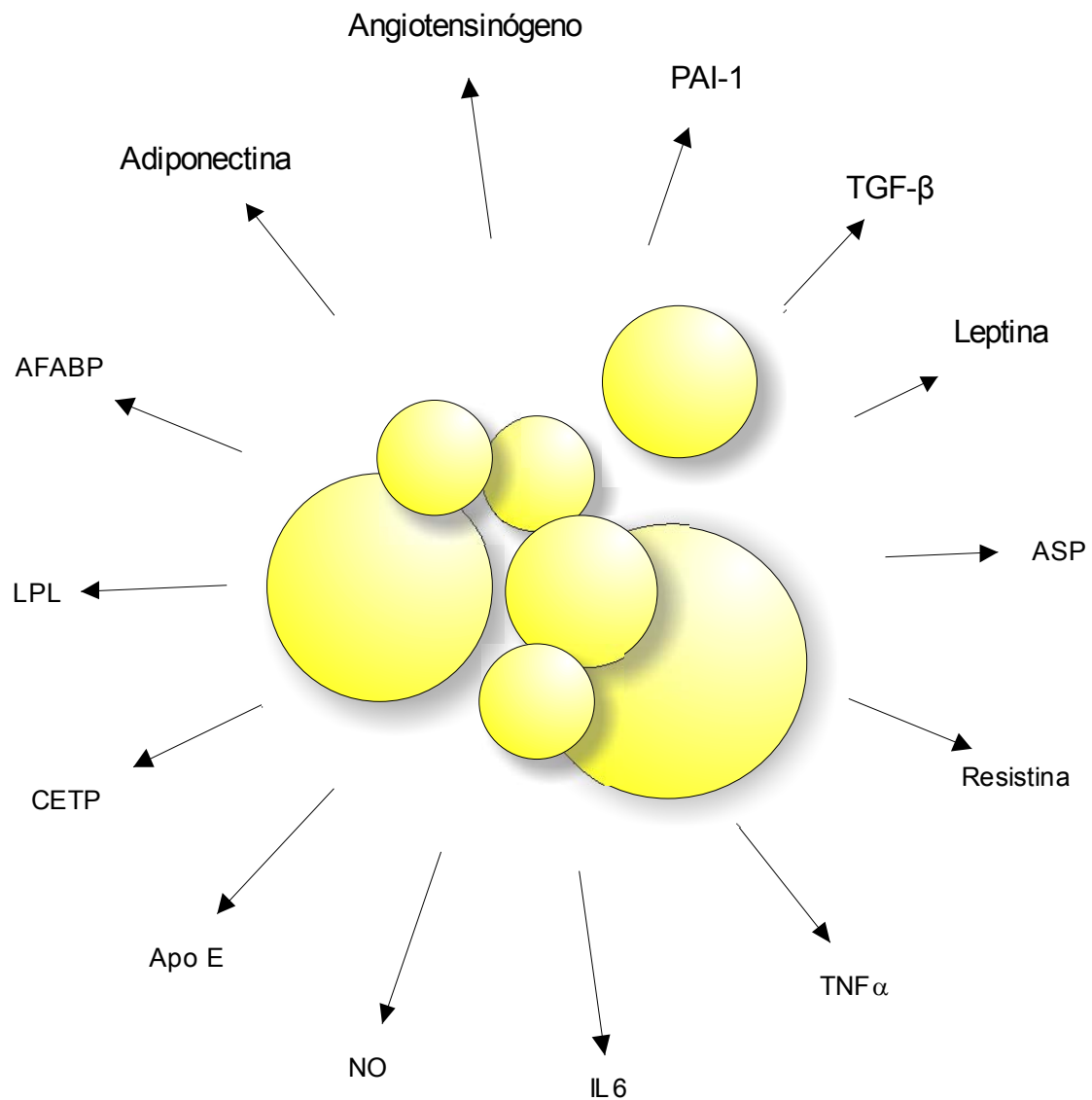


captación de glucosa que favorece la esterificación de los ácidos grasos y reducen su movilización. Además actúa a nivel de la adenilato ciclasa, inhibiendo la formación de AMPc, y de la fosfodiesterasa (PDE), estimulando la degradación del AMPc (activo) a 5'AMP (inactivo) (Yeaman, 1990). Este último mecanismo, el más importante a través del cual la insulina disminuye los niveles intracelulares de AMPc, lo realiza a través del mediador de los efectos metabólicos dependientes de la insulina, la fosfoinositol 3 kinasa (PI3-K), que activa por fosforilación a la PDE (Langin y col, 1996).

### **Factores secretados por el adipocito**

Al presente se conoce que además de la tradicional función de depósito de energía como triglicéridos y la consecuente producción de ácidos grasos de enorme importancia fisiológica, el adipocito posee actividad de célula secretora, operando como un órgano endócrino liberador de hormonas con producción de numerosas sustancias, llamadas adipocitoquinas (**Figura 3**). A través de estas sustancias no solo influye sobre la propia biología adipocitaria sino también sobre la regulación de la homeostasis energética, sensibilidad insulínica y metabolismo de lípidos y carbohidratos (Havel, 2004).

- Desde los años cincuenta, se conoce la existencia de un sistema capaz de regular la masa grasa por intermedio de una señal producida por las células grasas. Esta teoría lipostática se basa en el hecho de que una señal humoral generada en el tejido adiposo puede informar al cerebro sobre las reservas energéticas del organismo a fin de modificar la ingesta alimentaria, el peso corporal y el metabolismo energético (Havel, 2000), y la alteración de éste sistema conduce a la obesidad. La hormona producida se denomina **leptina** (del griego *leptos*: delgado) y el gen que codifica para ella se denomina gen *ob* el cual fue identificado y caracterizado por Zhang y col (1994). En términos generales, las concentraciones plasmáticas de



**Figura 3:** Factores secretados por el adipocito.

PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno-1, TGF-β: factor de crecimiento-β, NO: óxido nítrico, IL6: interleuquina 6, ASP: proteína estimulante de acilación, TNF-α factor de necrosis tumoral α, Apo E: apoproteína E, CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol, LPL: lipoproteína lipasa, AFABP: proteína que une ácidos grasos específica del tejido adiposo.





leptina son proporcionales a la masa grasa, elevadas cuando existe obesidad y bajas cuando hay pérdida de peso (Havel, 2000).

La influencia de la leptina sobre el gasto energético se ejerce probablemente a través del hipotálamo y de la estimulación de la producción de la hormona tiroidea T3 que induce el proceso de termogénesis (Legradi y col, 1997). Existen varios estudios que indican que la leptina podría igualmente aumentar el gasto energético modulando directamente la expresión de los genes de distintas proteínas desacoplantes (UCP) del tejido adiposo blanco y marrón, como así también del músculo esquelético, desacoplándose la  $\beta$  oxidación mitocondrial de la síntesis de ATP y estimulándose la termogénesis y la disipación de calor (Saleh y col, 2002).

Varias hormonas pueden modular la transcripción y secreción de la leptina “in vivo” e “in vitro”, siendo las más importantes la insulina y la norepinefrina. Estudios realizados en ratas machos Wistar, muestran que in vivo, el ayuno y la restricción alimentaria disminuye las concentraciones plasmáticas y la transcripción en tejido adiposo epididimal de leptina. Estos cambios están asociados con una disminución de la concentración plasmática de insulina, activación del sistema nervioso simpático, incremento de la lipólisis, y elevados niveles plasmáticos de ácidos grasos. La administración de insulina o la realimentación, revierte la concentración baja de leptina plasmática. La exposición al frío es otra condición fisiológica que disminuye dramáticamente los niveles de leptina en plasma y su transcripción en tejido adiposo a través del mecanismo mencionado anteriormente para el ayuno (Cammisotto y col, 2003).

Se ha observado en modelos animales alimentados con dieta grasa, un incremento en la expresión del gen *ob* en el tejido adiposo y en la concentración plasmática de leptina. Esto, sin embargo, no previno la hiperfagia y la obesidad, sugiriendo que los animales que reciben la dieta grasa desarrollan resistencia a la leptina (Anini1 y Brubaker, 2003) (Naggert y col, 1995).



La falta de respuesta a la leptina por mutaciones en el gen que codifica para el receptor de leptina, está asociada a resistencia insulínica y obesidad severa, como se observa en ratas Zucker *fa/fa* (Gilbert y col, 2003).

- La **adiponectina**, también conocida como proteína adipocitaria relacionada con el complemento 30 (ACRP30), gen de transcripción más abundante del tejido adiposo (apM1) y adipoQ; es otra proteína sintetizada por el adipocito. Tiene propiedades antiinflamatorias y antiaterogénicas ya que disminuye la síntesis de moléculas de adhesión endoteliales e inhibe la respuesta inflamatoria, pero además está involucrada en el metabolismo de hidratos de carbono y de lípidos sensibilizando a los tejidos a la acción de la insulina (propiedades antidiabetogénicas) (Weyer y col, 2001) (Hu y col, 1996) (Hotta y col, 2001).

La adiponectina tiene la capacidad, por un lado, de aumentar el efecto de la insulina sobre hepatocitos aislados, lo que favorece la disminución de la producción hepática de glucosa (Scherer, 2003), y por el otro lado de estimular la oxidación de los ácidos grasos en el músculo esquelético, lo que provoca una disminución plasmática de glucosa, ácidos grasos y triglicéridos y por lo tanto mejora la sensibilidad insulínica (Arner, 2003) (Havel, 2004).

Niveles plasmáticos bajos de adiponectina se correlacionan negativamente con la masa de tejido adiposo y se han asociado con varios componentes del Síndrome Metabólico, incluyendo distribución grasa intrabdominal, hiperlipidemia, niveles bajos de lipoproteína de alta densidad-colesterol (HDL-Col), resistencia insulínica y Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente (DMNID) (Havel, 2004).

La correlación negativa entre los niveles plasmáticos de adiponectina y grasa visceral es significativamente mayor que la correlación que presenta con la grasa subcutánea. Una explicación para este hecho es que la adiponectina es primariamente producida por el tejido adiposo



visceral, pero si estos adipocitos están sobrecargados de triglicéridos producen menos adiponectina. La acción de la adiponectina de sensibilizar a los tejidos a la acción de la insulina sugiere que la producción reducida de esta adipocitoquina contribuye a la ya conocida relación entre depósitos de grasa visceral y resistencia insulínica (Havel, 2004).

Aunque el proceso que regula la producción de adiponectina no ha sido completamente caracterizado, se conoce que el TNF- $\alpha$ , la interleuquina 6 (IL 6) y los agonistas  $\beta$  adrenérgicos reprimen su síntesis (Havel, 2004).

- La **resistina** fue recientemente identificada por el grupo de Stepan y col (2001). Esta adipocitoquina suprime la capacidad de la insulina de estimular la entrada de la glucosa en el adipocito, pero aún no se conoce completamente su acción sobre otros tejidos tales como músculo esquelético, hígado o cerebro. La resistina se encuentra implicada en el desarrollo de la resistencia insulínica e intolerancia a la glucosa. Sus concentraciones plasmáticas están elevadas en modelos animales de obesidad, genéticos o inducidos por dietas. La expresión de su gen y su secreción se encuentran fuertemente disminuidas por las thiazolidinediones (TZD) (Arner, 2003), drogas que aumentan la sensibilidad a la insulina por los tejidos periféricos, disminuyendo la hiperglucemia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia (Ferré, 2004).

- El **TNF- $\alpha$**  es una citoquina proinflamatoria clave en la modulación del metabolismo del adipocito, con un rol directo sobre varios procesos mediados por la insulina, incluyendo homeostasis de la glucosa y metabolismo de lípidos. Regula la producción de factores derivados del adipocito involucrados en la captación y metabolismo de lípidos, incluyendo LPL, proteína que une ácidos grasos (FABP) y acetil CoA sintetasa (ACS) (Arner, 2003).

La expresión de TNF- $\alpha$  aumenta con el incremento y disminuye con el descenso del peso corporal. El efecto neto del TNF- $\alpha$  es disminuir la



lipogénesis (captación de ácidos grasos y reesterificación a triglicéridos) e incrementar la lipólisis; y sus niveles están asociados tanto con hiperinsulinemia como con resistencia insulínica (Arner, 2003). Sonnenberg y col (2004) han observado que el uso de anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  en ratones obesos mejora notablemente la sensibilidad insulínica.

Hotamisligil y col (1993) observaron una mayor producción de TNF- $\alpha$  en diferentes modelos experimentales de obesidad y en pacientes obesos que presentan una resistencia a la acción de la insulina. Los estudios revelan que la acción del TNF- $\alpha$  sobre la acción insulínica se sitúa a nivel de sus señales, ya que el TNF- $\alpha$  sería responsable de una disminución de la actividad tirosina quinasa del receptor de la insulina, de la fosforilación del sustrato receptor de insulina (IRS-1) y también de la síntesis y translocación del GLUT 4 (Arner, 2003).

Además, el TNF- $\alpha$  reduce la expresión y secreción de la adiponectina, posiblemente a través de la activación de la producción de IL6, que también inhibe la secreción de adiponectina (Sonnenberg y col, 2004). La leptina estimula la síntesis y secreción de TNF- $\alpha$  (Das, 2002).

- La **Interleuquina 6 (IL 6)** es otra citoquina proinflamatoria y un tercio de su concentración plasmática es originado en el tejido adiposo. Incrementa los niveles de proteína C reactiva y de moléculas de adhesión que median los procesos inflamatorios, y que recientemente se han relacionado con las alteraciones presentes en el Síndrome metabólico (Das, 2002).

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



- Otra adipocitoquina sintetizada en el tejido adiposo es la **proteína estimuladora de la acilación (ASP)** que actúa de forma paracrina estimulando la captación de glucosa, y aumentando la actividad de la diacilglicerol acil transferasa (DAGAT) e inhibiendo la actividad de la HSL. Estas acciones incrementan la eficiencia de la síntesis y almacenamiento de triglicéridos en adipocitos, acelerando el clearance de ácidos grasos y triglicéridos de la circulación. La masa de tejido adiposo es el principal determinante de los niveles plasmáticos de ASP y por lo tanto estos se encuentran aumentados en sujetos obesos y con resistencia insulínica y disminuyen durante el ayuno y pérdida de peso corporal (Havel, 2004).

- La sintetasa de **óxido nítrico (NO)** está expresada en tejido adiposo blanco, indicando que el adipocito es una fuente de producción de NO. Recientemente se ha vinculado al NO con la lipólisis. Altas concentraciones intracelulares de NO inhiben la lipólisis mientras que concentraciones bajas son necesarias para que se produzca. También inhibe la disipación de energía y la lipogénesis (Schling y Löffler, 2002) (Frühbeck y col, 2001).

- El **Angiotensinógeno**, precursor de la angiotensina II, es sintetizado primariamente por el hígado aunque su ácido ribonucleico mensajero (mRNA) está expresado en varios tejidos, incluyendo el tejido adiposo. Se ha sugerido que tiene influencia en la diferenciación adipocitaria induciendo a las células grasas a producir prostaciclina. La expresión de angiotensinógeno en tejido adiposo está incrementada en obesidad y es regulada por el estado nutricional. Durante el ayuno disminuye en el tejido adiposo la secreción y la expresión génica (mRNA) de esta adipocitoquina. El angiotensinógeno podría jugar un papel en el incremento del flujo sanguíneo local del tejido adiposo y por lo tanto aumentar la disponibilidad de sustratos para la reesterificación de ácidos grasos. Así, afectando el flujo sanguíneo y promoviendo la diferenciación preadipocitaria, está capacitado



para regular el tamaño del adipocito en respuesta a señales nutricionales (Frühbeck y col, 2001).

- El **TGF- $\beta$**  (Factor de crecimiento  $\beta$ ) es una citoquina multifactorial capaz de regular el crecimiento y diferenciación de numerosos tipos celulares. Su expresión en tejido adiposo de ratones obesos es mayor que en sus respectivos controles, y el TNF- $\alpha$  contribuye a este aumento. De esta manera, incrementa la proliferación celular y contribuye a la elevada celularidad presente en los depósitos grasos relacionada con el fenotipo de obesidad (Frühbeck y col, 2001).

- La expresión y secreción del **Inhibidor del Activador de Plasminógeno -1 (PAI-1)** por el tejido adiposo ha sido demostrada aunque se conoce muy poco sobre su regulación a nivel del adipocito. Es un potente inhibidor del sistema fibrinolítico, y por lo tanto, concentraciones plasmáticas elevadas favorecen las complicaciones tromboembólicas. También, se ha reportado una correlación positiva de sus niveles plasmáticos con la distribución abdominal del tejido adiposo y con resistencia insulínica. La insulina, el TGF- $\beta$  y el TNF- $\alpha$  estimulan su secreción (Frühbeck y col, 2001).

- Además el tejido adiposo secreta importantes reguladores del metabolismo de lipoproteínas como **LPL**, apolipoproteína E (**apo E**) y proteína transportadora de esterios de colesterol (**CETP**).

**Por lo tanto, la regulación de la masa grasa es multifactorial. Además del rol clave de la diferenciación adipocitaria y el equilibrio entre el depósito y la movilización de los ácidos grasos, también intervienen de forma igualmente importante todos los factores secretados por el adipocito.**

Las alteraciones que se producen en el tejido adiposo y que contribuyen, entre otras, al desarrollo de dislipidemia, resistencia insulínica y DMNID, anomalías metabólicas todas ellas presentes en el Síndrome



Metabólico, pueden ser analizadas utilizando distintos modelos experimentales.

- **Modelos experimentales de dislipidemia, resistencia insulínica y diabetes tipo 2 asociados o no a obesidad:**

### **Genéticos**

#### **Rata ZDF (rata Zucker Diabética y Obesa)**

La rata ZDF se caracteriza por una resistencia insulínica asociada a una obesidad debido a la mutación *fa* del gen que codifica para el receptor de la leptina, que lleva a una señalización anormal (Peterson y col, 1990) (Phillips y col, 1996). La rata macho ZDF desarrolla una diabetes tipo 2 entre la 7ma y la 10ma semana de vida. El estado prediabético está marcado por un aumento de la secreción de insulina basal o estimulada por la glucosa, un aumento de la masa de las células  $\beta$ , como así también por un aumento de su contenido de triglicéridos. El pasaje de prediabetes a diabetes se caracteriza por hiperinsulinemia basal y disminución de la secreción de insulina bajo el estímulo de la glucosa. El aumento de los triglicéridos intracelulares son el origen de la disfunción de la célula  $\beta$  en la rata ZDF y llevan a la aparición de la diabetes (Unger, 1997). Es interesante notar que la mutación *fa* del receptor de la leptina no puede explicar por sí solo el fenotipo de la rata macho ZDF, ya que la hembra, obesa e insulino resistente, no presenta diabetes pero porta la mutación.

La translocación de la proteína GLUT4 se encuentra alterada en el tejido adiposo de las ratas ZDF. La insulino resistencia presente en tejido adiposo es inducida por la glucotoxicidad resultante de la hiperglucemia de este modelo (Nawano y col, 2000).



### **Rata obesa Zucker *fa/fa***

Está caracterizada por una resistencia insulínica asociada a obesidad severa. Como en la rata ZDF, esta mutación *fa* que afecta al gen del receptor de la leptina y que pierde por lo tanto su funcionalidad, comienza con hiperfagia que lleva a la obesidad. Esta obesidad se declara a las 4 semanas de edad, y se combina con una hiperinsulinemia, pero contrariamente a la rata ZDF, la rata Zucker *fa/fa* permanece normoglucémica (Bray, 1977) (Zucker y Antoniades, 1972).

A nivel pancreático, la rata Zucker *fa/fa* presenta a la vez hipertrofia e hiperplasia de las células  $\beta$ . La rata obesa secreta proporcionalmente más insulina que su control delgado en respuesta a la misma sobrecarga de glucosa.

No se conoce claramente si la hiperinsulinemia de la rata Zucker *fa/fa* es un factor primario o secundario a la instalación de la resistencia insulínica, principal característica fisiológica de este modelo. La resistencia insulínica puede igualmente ser la consecuencia de la obesidad y del desarrollo del tejido adiposo blanco que lleva a una producción elevada de TNF- $\alpha$ , responsable de alterar las vías de señal de insulina.

En la rata Zucker *fa/fa* la obesidad se debe, no solo a la derivación de los sustratos energéticos hacia el almacenamiento como triglicéridos en el tejido adiposo, sino también a una mayor lipogénesis (Lopez-Soriano y col, 1991). Por otra parte, la expresión de la adiponectina en este tejido se encuentra disminuida, volviendo a valores normales cuando existe una reducción del peso corporal (Milan y col, 2002).





## **Espontáneos**

### **Genético sin obesidad**

#### **La rata GK (Goto y Kakizaki)**

Este modelo ha sido obtenido por Goto y col (1977). Fue producido por cruces repetidas y selectivas de ratas Wistar no diabéticas pero con intolerancia a la glucosa. A partir de la 37<sup>ma</sup> generación, todas las ratas GK fueron diabéticas, reproduciendo espontáneamente los problemas característicos de la diabetes tipo 2: hiperglucemia moderada en ayuno, neta intolerancia a la glucosa, franca alteración de la secreción de insulina inducida por la glucosa y finalmente resistencia periférica y hepática a la insulina, sin obesidad. Con la progresión de la enfermedad, el modelo también desarrolla complicaciones características de la DMNID, como ser daño tisular pancreático con pérdida progresiva de células  $\beta$  en islotes por fibrosis (Koyama y col, 1998).

La utilización de la glucosa (Abella y col, 2003) y la activación de la glicerol 3 fosfato acil transferasa (G3PAT) inducida por la insulina (Farese y col, 1994) se encuentra disminuida en adipocitos de ratas GK.

### **Genético con obesidad**

#### **La rata OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty)**

Se caracteriza por manifestaciones tempranas de sobrepeso asociado a hiperinsulinemia. A partir de la 18<sup>va</sup> semana de vida se desarrolla espontáneamente la hiperglucemia, una hiperplasia de los islotes pancreáticos y finalmente la aparición de complicaciones renales. Todas estas alteraciones hacen que este modelo presente similitudes con la diabetes tipo 2 en el hombre. Otra gran característica del modelo es que a partir de la 40<sup>ta</sup> semana de vida, estas ratas se convierten en insulino-



dependientes: pierden peso progresivamente, desarrollan poliuria, la hiperglucemia se agrava y la insulinemia disminuye (Kawano y col, 1992).

En tejido adiposo, los niveles de mRNA y de proteína GLUT4 se encuentran significativamente disminuidos, junto con la captación de glucosa basal e inducida por insulina por parte de los adipocitos (Furuta y col, 2002). Por otro lado, el tejido adiposo de las ratas OLETF muestra un incremento en la expresión de la proteína PPAR y del SREBP (proteína de unión al elemento regulador de esterol), factores de transcripción asociados con el metabolismo lipídico (Kajita y col, 2003).

### **Inducida por fármacos**

#### **Sin obesidad**

#### **Rata diabética STZ (Streptozotocina)**

La rata STZ es un modelo de diabetes tipo 2 inducido por la administración de STZ durante el período neonatal (Bonner-Weir y col, 1981) (Portha y col, 1979), frecuentemente nombrada en la literatura “modelo x-STZ”, donde x representa el día de inyección. La streptozotocina destruye selectivamente las células  $\beta$  pancreáticas y la severidad de su acción depende de la especie de la rata y del momento de la inyección de la STZ.

Lacasa y col (1983) observaron una disminución del contenido de lípidos en adipocitos de ratas tratadas con STZ, probablemente como consecuencia de un defecto en la lipogénesis debido a una reducida actividad de la LPL y de la captación de glucosa.

- **Modelos experimentales de resistencia insulínica, dislipidemia y anormal homeostasis a la glucosa por manipulaciones nutricionales.**

#### **Dieta grasa (DG) (presencia de obesidad)**



En la rata normal, una dieta rica en lípidos saturados (> a 60% de la energía total) puede inducir una resistencia insulínica en tejidos blancos a la acción de la insulina (hígado, músculo esquelético y tejido adiposo) asociada a dislipidemia, anormal homeostasis a la glucosa y obesidad (Storlien y col, 1996) (Storlien y col, 1986) (Kraegen y col, 1986) (Oakes y col, 1997).

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, 1997) (Kraegen y Cooney, 1999) (Schmitz-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 de la PI3K (Bell y col, 2000) (Taouis 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 (Anini1 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).

### **Dieta rica en sacarosa (DRS) (presencia de adiposidad visceral)**

Un régimen dietario rico en hidratos de carbono simples (sacarosa, fructosa, etc) induce rápidamente, en la rata normal, la aparición de hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa (Lombardo



y col, 1983) (Pagliassotti y col, 1996) (Reaven y col 1979) (Ahrens y col, 1961).

Laube y col (1973) observaron efectos metabólicos diferentes cuando se ingiere almidón (hidrato de carbono complejo) en comparación a la ingesta de disacáridos (sacarosa) o monosacáridos (glucosa y fructosa). Estos estudios demostraron niveles plasmáticos elevados de triglicéridos y ácidos grasos en ratas alimentadas con disacáridos o monosacáridos en comparación con los animales alimentados con almidón durante el mismo período de tiempo.

Diferentes investigadores, incluyendo nuestro grupo (Reaven, 1984) (Vrřana y Kazdova, 1986) (Lombardo y col, 1983) (Gutman y col, 1985 a) (Chicco y col, 1990) (Bernal y col, 1995) demostraron que ratas jóvenes alimentadas por un corto período de tiempo (3-5 semanas) con una dieta rica en sacarosa (DRS) desarrollaban hipertrigliceridemia, elevados niveles de ácidos grasos, incremento de triglicéridos hepáticos y mayor secreción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-Tg), anormal homeostasis a la glucosa e hiperinsulinemia en ausencia de obesidad. Esto se acompaña de resistencia insulínica periférica global y moderada hipertensión (Thorburn y col, 1989) (Storlien y col, 1988) (Young y col, 1988) (Pagliassotti y col, 1996) (Storlien y col, 1993 a). El desarrollo de resistencia insulínica hepática y periférica 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 (Pagliassotti y col, 2002).

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).

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 del tejido adiposo epididimal. Además Peyron-Caso y col (2002 a) 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.

Numerosos trabajos señalan que intervenciones farmacológicas (diazóxido, clofibrato, prazosin, benfluorex) y nutricionales (cambios en la composición de ácidos grasos de la dieta), muchas de las cuales descienden los niveles de triglicéridos plasmáticos, previenen el desarrollo de dislipidemia y resistencia insulínica (Gutman y col, 1985 a) (Gutman y col, 1985 b) (Belahsen y Deshaies, 1993) (Storlien y col, 1993 b) (Klimes y col, 1993) (Rizkalla y col, 1993).

Son escasos los estudios sobre los mecanismos responsables de las consecuencias metabólicas de una ingesta prolongada de fructosa o sacarosa (Blakely y col, 1982) (Chicco y col, 1999) (Lombardo y col, 1996 a) (Schonfeld y Pflieger, 1971). La magnitud de los cambios endócrino-metabólicos inducidos por la ingesta de una dieta rica en sacarosa, depende de la cronicidad de la dieta. Al respecto, trabajos previos de nuestro grupo demostraron que el perfil metabólico y hormonal de este modelo experimental, evoluciona en función del tiempo de ingesta desde normoglucemia e hiperinsulinemia (3-5 semanas: período de inducción), con normalización espontánea de estos parámetros y de la dislipemia al cabo de 6-8 semanas (período de adaptación) a hiperglucemia y normoinsulinemia



(13-15 semanas continuando al menos hasta 40 semanas de ingesta: período de recurrencia) (Lombardo y col, 1983) (Chicco y col, 1990) (Chicco y col, 1991) (Gutman y col, 1987) (Chicco y col, 1999) (Bernal y col, 1995) (Lombardo y col, 1996 a) (Montes y col, 2000). Los niveles de ácidos grasos plasmáticos incrementados a las 3 semanas son aún más elevados a partir de las 13-15 semanas de ingesta de DRS.

La sensibilidad insulínica periférica global (clamp euglucémica-hiperinsulinémica) decrece significativamente luego de 3-5 semanas de dieta y continúa deteriorándose en función del tiempo de ingesta a partir de las 13-15 semanas (Chicco y col, 2000). Estas anomalías conducen a cambios en la utilización del combustible energético (lípidos vs. glucosa) a nivel del músculo esquelético. En este tejido se observa que un continuo y progresivo deterioro de las vías oxidativas y no oxidativas de la glucosa acompaña la insensibilidad insulínica periférica global (D'Alessandro y col, 2000). A partir de las 3 semanas de ingesta un significativo incremento de acil-CoA de cadena larga es la manifestación más temprana de un disturbio del metabolismo lipídico en dicho tejido, que continúa deteriorándose con la cronicidad de la dieta. Al respecto, un incremento en el contenido de los acil-CoA, triglicéridos, DAG y masa proteica de la PKC  $\theta$  a nivel de membrana puede constatarse en el músculo esquelético de los animales alimentados con DRS durante 30 semanas, lo que podría constituir un nexo entre resistencia insulínica y el contenido lipídico en dicho tejido (D'Alessandro y col, 2006).

Anormalidades del metabolismo lipídico pueden modular a nivel pancreático la secreción de insulina. Chicco y col (2003) demostró un deterioro en el patrón bifásico de insulina bajo el estímulo de la glucosa de islotes perifundidos de ratas alimentadas con DRS durante 30 semanas. Más aún, al cabo de este tiempo, constatamos en el páncreas endocrino, un significativo incremento del área y número de las células  $\beta$ , así como un alterado perfil de la distribución celular del islote. Estas alteraciones no se



acompañaron de un aumento del contenido pancreático de Insulina Inmunoreactiva (IRI) (Lombardo y col, 1996 a).

El tejido adiposo juega un rol clave en la provisión de ácidos grasos plasmáticos. Sin embargo, al presente son escasos los datos disponibles en la literatura respecto a los cambios morfológicos, metabólicos y moleculares y su relación con la homeostasis de la glucosa y resistencia insulínica cuando la dieta rica en sacarosa es administrada durante un período prolongado de tiempo (30-40 semanas) (Cohen y col, 1972) (Blakely y col, 1982).

Como mencionáramos anteriormente, el perfil metabólico-hormonal que acompaña a la resistencia insulínica luego de una ingesta prolongada de DRS es muy diferente al observado luego de un corto período de dieta (período de inducción), a lo que debemos agregar un ligero incremento del peso corporal (aproximadamente 15%) y un muy significativo incremento del peso del tejido adiposo epididimal y de los niveles de ácidos grasos plasmáticos (Chicco y col, 1999).

Con respecto a las intervenciones nutricionales, la mayoría de los estudios experimentales que examinan la relación entre los componentes de la dieta y la insulino resistencia se han enfocado en la prevención de esta alteración, pero muy pocos han examinado la posibilidad de mejorarla y/o revertirla. Al respecto, desde hace algunos años se ha incrementado el interés en el consumo de aceites de pescado ricos en ácidos grasos n-3 polinsaturados, especialmente aquellos de origen marino, ácidos eicosapentaenoico (20:5, n-3) y docosahexaenoico (22:6, n-3) que abundan en los peces, ostras y animales marinos y escasean o están ausentes en animales y plantas terrestres (Din y col, 2004).

Este interés surge a través de numerosos estudios e investigaciones clínicas y experimentales que han sugerido que la incorporación de estos ácidos grasos en las dietas tendría efectos beneficiosos (Harris y col, 1997)





(Mori y col, 2000) (Kris-Etherton y col, 2002) (Hwang, 2000) ya que parecen jugar un importante rol protector contra los síntomas adversos del Síndrome Plurimetabólico. Los ácidos grasos n-3 de origen marino pueden mejorar o prevenir situaciones tales como degeneración vascular aterosclerótica (Kinsella y col, 1990), enfermedad coronaria, dislipemias, intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus tipo 2, resistencia insulínica, hipertensión, etc. (Simopoulos y col, 1999) (Storlien y col, 1991). Existen numerosos trabajos a nivel experimental que demuestran que el aceite de pescado dietario disminuye el contenido de triglicéridos plasmático y tisular. En músculo esquelético, por ejemplo, mejora la acción de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa previniendo el desarrollo de resistencia insulínica cuando se lo administra conjuntamente con dietas ricas en grasas o sacarosa por períodos cortos de tiempo (3-6 semanas) (Klimes y col, 1993) (Podolín y col, 1998) (Storlien y col, 1987).

En este contexto Lombardo y col. (1996 b) demostraron en animales alimentados con DRS por un período prolongado de tiempo (15 semanas), que la sustitución parcial del tipo de grasa dietaria (aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao) durante las 4 últimas semanas de experimentación, normaliza la dislipidemia y la homeostasis de la glucosa sin modificaciones en la insulinemia.

Se han postulado diferentes mecanismos a través de los cuales los ácidos grasos n-3 ejercerían su acción. Estudios recientes sugieren que los ácidos grasos n-3 actuarían como mediadores importantes de los eventos nucleares que gobiernan la expresión de genes específicos involucrados en el metabolismo de los lípidos y la glucosa. Esta acción la realizarían vía factores de transcripción como el receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPARs) y la proteína que une al elemento regulador de esteroides-1 (SREBP-1c) (Jump, 2002).

El factor de transcripción SREBPs tiene un rol importante sobre la expresión de genes que codifican para enzimas lipogénicas, promoviendo la





actividad de varias enzimas hepáticas como FAS y ACC. Los ácidos grasos polinosaturados n-3 disminuyen los niveles hepáticos de mRNA de SREBP-1c y por consiguiente la forma madura de SREBP-1 en hígado, con la correspondiente disminución de los niveles de mRNA de enzimas lipogénicas y colesterogénicas (Xu y col, 1999).

Otros autores (Neschen y col, 2002) (Halvorsen y col, 2001) han demostrado que el aceite de pescado n-3 dietario administrado a ratas, incrementa la capacidad oxidativa hepática a través de la habilidad para funcionar como ligando activador de los PPAR $\alpha$ , y por este medio induciendo la transcripción de varias proteínas que codifican genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos.

Los ácidos grasos n-3 son también ligandos naturales de los PPAR $\gamma$ , moduladores claves de la homeostasis de lípidos, y así promueven la diferenciación adipocitaria y activan genes que codifican para proteínas relacionadas directamente con el metabolismo lipídico como aP2, LPL, etc (Walczak y Tontonoz, 2002).

Además, estudios experimentales, sugieren que un mayor contenido de ácidos grasos polinosaturados (por ejemplo n-3) en la composición de ácidos grasos en los fosfolípidos de membrana de los tejidos “blanco” a la acción de la insulina (tales como, hígado, tejido adiposo, y músculo esquelético) son un factor crítico que influencia la acción biológica de la insulina (Ej. cambios en la fluidez de membranas, función de segundo mensajero del diacilglicerol, etc.) (Luo y col, 1996) (Clamp y col 1997) (Storlien y col, 1996).

El efecto de los ácidos grasos n-3 para revertir las alteraciones producidas por la administración crónica de una DRS, ha sido escasamente estudiado en algunos tejidos (músculo, hígado) (Podolín y col, 1998) (Lombardo y col, 1996 b) (D’Alessandro y col, 2000) y menos aún en relación con el metabolismo del tejido adiposo.



De todo lo expuesto anteriormente y dado la importancia fisiológica del tejido adiposo y la complejidad de su metabolismo, en constante interacción con diferentes factores hormonales y nutricionales, este trabajo de tesis se propone evaluar la participación de dicho tejido en las distintas alteraciones endocrino-metabólicas presentes en el modelo experimental de hipertrigliceridemia y resistencia insulínica inducido por una ingesta crónica de una dieta rica en sacarosa. Para ello, los

**OBJETIVOS GENERALES** del presente trabajo son:

1. Analizar algunos mecanismos que relacionen cambios morfológicos, funcionales y moleculares del tejido adiposo en el modelo experimental de dislipidemia y resistencia insulínica inducido por la administración prolongada de una dieta rica en sacarosa,

2. Determinar de que manera estos cambios contribuyen a la hiperglucemia, resistencia insulínica y dislipidemia, y

3. Analizar si la sustitución parcial del tipo de ácidos grasos de la dieta (Aceite de maíz –rico en ácidos grasos n-6, por aceite de hígado de bacalao -rico en ácidos grasos n-3) contribuye a mejorar y/o revertir estas anormalidades metabólicas.

De acuerdo a los objetivos generales propuestos y a las consideraciones globales y fundamentos sobre la importancia del tema a analizar, los

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS** propuestos son:

- Evaluar algunas vías metabólicas involucradas en la regulación de la masa grasa que puedan influenciar el balance energético y contribuir a la hipertrofia celular del tejido adiposo. En particular se analizará: a) enzimas implicadas en la captación y síntesis de ácidos grasos, b) actividad



---

lipolítica basal y frente a estímulos, actividad antilipolítica de la insulina, c) captación de glucosa basal y frente al estímulo de insulina.

- Analizar el rol de la leptina y adiponectina, explorando si cambios en estas adipocitoquinas (niveles plasmáticos y expresión génica) participan en la resistencia insulínica y adiposidad inducida por la ingesta de una dieta rica en sacarosa.

- Evaluar los posibles efectos beneficiosos de la suplementación dietaria de ácidos grasos n-3 de origen marino sobre las alteraciones metabólicas anteriormente mencionadas.



## MATERIALES Y METODOS

### I-Animales de experimentación y dietas

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

El **grupo control** recibió una dieta semisintética cuya fuente de hidratos de carbono fue almidón (62,5% p/p) (DC). El **grupo experimental** fue alimentado con la misma dieta semisintética con la única modificación en la fuente de hidratos de carbono: la sacarosa reemplazó al almidón (62.5% p/p) (DRS). En ambas dietas la fuente de grasa fue el aceite de maíz 8% p/p (AM).

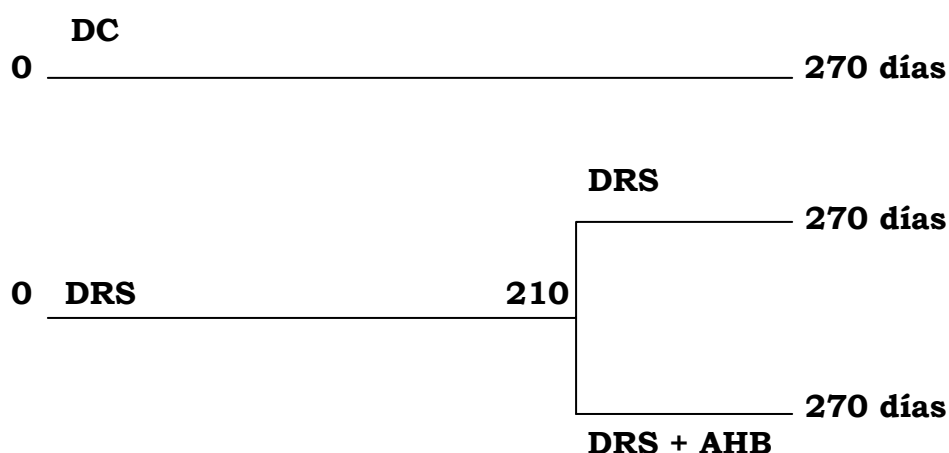
Luego de 210 días de ingesta el grupo experimental DRS se dividió aleatoriamente en dos subgrupos: un subgrupo continuó con la dieta rica en sacarosa 62.5% p/p hasta el final de la experiencia (270 días), mientras que en el otro subgrupo se sustituyó la fuente de grasa de 8% AM por 7% aceite de hígado de bacalao (AHB: rico en ácidos grasos poliinsaturados n-3) más 1% aceite de maíz (ver esquema experimental).



Los animales del grupo control continuaron con la DC hasta alcanzar los 270 días de ingesta.

Las dietas control y DRS fueron balanceadas en colesterol, vitamina A y D presentes en la dieta DRS + AHB durante los últimos 60 días de experiencia.

### Esquema experimental



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

En la **tabla 1** se describe la composición (% en peso y % en energía) de las dietas administradas. Las dietas son isocalóricas, proveen aproximadamente 16,24 Kjoule/100g de comida y fueron administradas “ad libitum” durante el período experimental. El aceite de hígado de bacalao (AHB) fue separado en alícuotas bajo corriente de nitrógeno, guardado a -20°C e incorporado diariamente a la dieta descongelando las alícuotas necesarias de acuerdo al tamaño del lote de animales en experimentación.



Más detalles sobre la preparación, contenido y manejo de las dietas se han descrito previamente por nuestro grupo (Gutman y col, 1987).

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

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

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

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



potasio, 0,01; selenato de sodio, 0,01025; para-molibdato de amonio, 0,00795; cromato de potasio, 0,275.

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

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

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



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

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

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

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

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





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

## **II- Obtención de muestras de sangre y tejidos:**

Finalizado el período experimental, los animales fueron pesados y anestesiados en forma intraperitoneal con pentobarbital sódico (60 mg/Kg de peso corporal) y las experiencias se llevaron a cabo entre las 8 y 10hs, a excepción de aquellos destinados a la experiencia de la clamp euglicémica-hiperinsulinémica y a la perfusión de páncreas, en los cuales se procedió como se detalla más adelante.

-Las muestras de sangre fueron extraídas de la vena cava inferior, colocadas en tubos de centrifuga (con o sin anticoagulante, según el ensayo) previamente enfriados a temperatura del N<sub>2</sub> líquido y centrifugadas en centrifuga refrigerada a 4°C. El plasma o suero obtenido se procesó en el momento o se conservó a -20°C hasta su procesamiento (dentro de los tres días siguientes o no mayor a una semana). Estas muestras se utilizaron para cuantificar los niveles de glucosa, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados, leptina, adiponectina e insulina.

-Los tejidos adiposos fueron obtenidos inmediatamente después de la extracción de sangre y de acuerdo a la técnica a realizarse, se utilizaron de inmediato (aislamiento de adipocitos, etc.) o fueron congelados a la temperatura de nieve carbónica utilizando una pinza de Wollemberger (Wollemberger y col, 1960) previamente enfriada a dicha temperatura. Así congelados fueron pulverizados en un mortero con nieve carbónica y



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

-Los islotes pancreáticos fueron aislados por digestión con colagenasa y colectados bajo microscopio estereoscópico, como se indica en detalle en el ítem **III-5**.

### **III- Procedimientos experimentales:**

#### **Métodos Analíticos**

##### **III-1) Determinaciones séricas:**

###### **Glucosa:**

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

###### **Triglicéridos:**

Cuantificados por método espectrofotométrico de acuerdo a la técnica descrita por Laurell (1966). Brevemente, se extraen los lípidos utilizando como solvente no polar una mezcla de éter isopropílico/etanol (95:5 v/v) al tiempo que se extraen los fosfolípidos con ácido silícico. Los triglicéridos contenidos en el sobrenadante se someten 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 expresan como mmol/L.

### **Ácidos grasos no esterificados:**

Se cuantificaron a través del método espectrofotométrico 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 ácidos grasos presentes en la muestra. Se utilizó para esta determinación el kit enzimático comercial WACO NEFA-C (Wako Chemicals USA Inc., Richmond, Virginia, USA). Los resultados se expresan como  $\mu\text{mol/L}$ .

### **Insulina:**

La insulina inmunorreactiva (IRI) fue dosada por el método propuesto por Herbert y col. (1965) utilizando como estándar insulina de rata (Novo Denmark). La sensibilidad fue de 0.5  $\mu\text{U/ml}$ , con un coeficiente de variación (CV) intra-ensayo de 8.7%, 6.2% y 5.1% para los rangos de determinación de 1-5, 5-10 y 10-50  $\mu\text{U}$  de insulina/ml respectivamente y coeficientes de variación inter-ensayo de 6.6%, 5.0% y 5.2% para dichos rangos. Los resultados se expresan como pmol/L.

### **Leptina y Adiponectina:**

Se determinaron por radioinmunoensayo (Linco, Clinisciences, Montrouge, France). Este método utiliza un antisuero específico para el antígeno en estudio (Leptina ó Adiponectina) y el antígeno marcado radioactivamente con  $^{125}\text{I}$ odo. Una curva estándar se construyó con concentraciones crecientes del estándar de antígeno no marcado y a partir



de ésta curva, la concentración de antígeno en muestras incógnitas pudo ser calculada.

Los resultados se expresaron como ng/ml para leptina y  $\mu\text{g/ml}$  para adiponectina.

### **III-2) Capacidad de utilización de la glucosa por los tejidos “in vivo”.** **Clamp euglucémica-hiperinsulinémica:**

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

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

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

Brevemente, las ratas ayunadas durante un período de 5 horas fueron anestesiadas y se les colocó una cánula en la vena yugular derecha, a través de la cual se extrajeron muestras de sangre para la determinación de los niveles de glucosa e insulina durante el transcurso de la experiencia. La



vena yugular izquierda se canalizó con cánula de doble entrada, infundiéndole por una de ellas insulina (0.8 U/Kg hora) a velocidad constante durante dos horas, por medio de una jeringa de infusión. En toda la experiencia la glucemia fue mantenida en su nivel basal (5.5-6.0 mM, euglucemia) por medio de una infusión de una solución de glucosa 20% (p/v) a velocidad variable usando una bomba peristáltica (Sage Instruments model 355) conectada a la segunda entrada de la cánula. La infusión de glucosa comenzó a los 5 minutos posteriores a la iniciación de la infusión de insulina.

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

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

### **III-3) Determinaciones en tejido adiposo epididimal:**

#### **III-3.1 Aislamiento de adipocitos de tejido epididimal:**

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

Para el aislamiento de adipocitos se utilizó la metodología indicada por Rodbell (1964). Brevemente, alrededor de un gramo de tejido epididimal



se colocó en un erlenmeyer de 25 ml conteniendo 3 ml de buffer Krebs-Henseleit fosfato (pH=7,4) adicionado de:  $\text{Ca}^{+2}$  1,25 mM, glucosa 5,5 mM, albúmina sérica bovina esencialmente libre de ácidos grasos (fracción V) 40 mg/ml y colagenasa aislada del *Clostridium histolyticum* (específica para el aislamiento de adipocitos) 1 mg/ml, a 37°C. La digestión se realizó en un agitador metabólico tipo Dubnoff a 37°C durante 1 hora, con una agitación de 60-80 giros/minuto. La liberación de células se puso de manifiesto con un incremento en la turbidez del medio de incubación. Finalizado el tiempo de incubación, las células grasas se separaron del estroma y de los vasos sanguíneos por filtración a través de una malla de nylon, presionando suavemente sobre una varilla de vidrio. La suspensión de células obtenidas se centrifugó durante un minuto a 400xg, de esta manera los adipocitos flotan en la superficie mientras que las células vasculares y del estroma (capilares, macrófagos, mastocitos y células epiteliales) sedimentan.

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

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

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



### **III-3.2 Determinación del diámetro, área y volumen promedio de los adipocitos aislados:**

Los métodos más utilizados para la determinación del tamaño de los adipocitos incluyen:

- 1) Examen microscópico de preparaciones fijas de secciones delgadas del tejido intacto.
- 2) Determinación electrónica del tamaño celular de adipocitos aislados del tejido fijado previamente con tetróxido de osmio.
- 3) Examen microscópico de preparaciones frescas de células aisladas por digestión por colagenasa.

Este último, la determinación directa de la distribución de los diámetros de adipocitos coloreados aislados con colagenasa, requiere un equipamiento mínimo y permite determinar los diámetros celulares en forma rápida y precisa. Este método, propuesto por Di Girolamo y col (1971), fue utilizado por nuestro grupo en trabajos previos (Soria y col, 2001), detallándose brevemente a continuación:

A 1 ml de la suspensión celular (obtenido según lo descrito en el ítem anterior) se le agregaron 2-3 gotas de una solución acuosa de Azul de Metileno al 1%. Una alícuota de esta suspensión de células grasas teñidas se ubicó en un portaobjetos y se examinó al microscopio. Los diámetros de los adipocitos aislados se midieron con un aumento de 400X, utilizando un ocular graduado provisto con una escala con intervalos regulares de 2,5 $\mu$  cada uno.

Las células grasas se reconocieron por su forma esférica, su núcleo teñido con uno o dos nucleolos y su citoplasma coloreado. Las células se enfocaron en la escala calibrada y, ubicando el plano ecuatorial de las mismas, se determinó el diámetro de cada una de ellas. Se recopilaron los



diámetros celulares en clases cuyos puntos medios son múltiplos sucesivos de  $2,5\mu$ , construyendo de esta manera un histograma de frecuencia de diámetros celulares.

La medición y el agrupamiento de 100 células grasas correspondientes a cada epidídimo analizado fueron realizados por un único observador, durante 15-20 minutos. Este período de tiempo es crítico, debido a que las células comienzan a deformarse cuando el mismo se prolonga, en cuyo caso debe utilizarse un nuevo preparado celular. A partir de estos datos se calculó el diámetro celular medio (DCM) y su varianza ( $S^2$ ).

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

$$VCM = \pi/6 (3S^2 + DCM^2) DCM,$$

donde:  $\pi = 3,1416$ ,

DCM = diámetro celular medio,

y  $S^2$  = varianza del diámetro celular medio.

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

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

$$VCM = \Sigma niVi/n,$$

donde:  $Vi$  = volumen correspondiente al diámetro  $Xi$ ,





$n_i$  = frecuencia correspondiente al diámetro  $X_i$ ,

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

### **III-3.3 Determinación del contenido lipídico celular medio.**

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

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

De esta manera:  $CLCM = VCM \times \delta_{TO}$ ; donde  $\delta_{TO}$  es la densidad de la trioleína.

### **III-3.4 Determinación de la celularidad del tejido adiposo epididimal.**

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

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

Para determinar el CLT del tejido adiposo se realizó una extracción de los lípidos totales homogeneizando una porción del tejido con una mezcla cloroformo/metanol (2/1 v/v) en un homogeneizador del tipo Potter-



Elvenhjen, procediendo de acuerdo al método propuesto por Folch y col (1957). Considerando que los triglicéridos son la fracción constitutiva más importante de los lípidos adipocitarios, se determinó su concentración en el extracto lipídico, dosando el glicerol liberado luego de la saponificación de los mismos.

Aunque la metodología empleada en los ítems **III-3.2**, **III-3.3** y **III-3.4** está sujeta a las limitaciones impuestas por el uso de ciertas suposiciones, es importante destacar algunos aspectos valiosos de la misma:

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

### **III-3.5 Determinación del número de adipocitos en la suspensión celular.**

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



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

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

### **III-3.6 Determinación de la lipólisis basal e inducida en adipocitos aislados.**

Se colocaron alícuotas de la suspensión celular (aprox.  $1 \times 10^5$  células/ml) obtenida de acuerdo con lo descrito anteriormente, en recipientes de vidrio siliconizados determinándose en paralelo lipólisis basal (a tiempo 0 y 60 minutos) y lipólisis inducida para cada una de las muestras analizadas.

Los adipocitos fueron incubados en buffer Krebs-Henseleit fosfato (pH=7,4) adicionado de  $\text{Ca}^{+2}$  1,25 mM, glucosa 5,5 mM y albúmina sérica bovina (fracción V) esencialmente libre de ácidos grasos 40 mg/ml y en el caso de la lipólisis inducida, con (-) - isoproterenol (N-isopropil-noradrenalina, agonista  $\beta$ -adrenérgico) en una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M. La incubación se realizó durante una hora a 37°C, en un agitador metabólico (60 ciclos/minuto), bajo una atmósfera de  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95%:5%). Finalizado el tiempo de incubación, se extrajo una alícuota del medio infranadante libre de células grasas y se procedió inmediatamente a su desproteinización, con ácido perclórico 1 N. La mezcla se agitó vigorosamente y luego se centrifugó 15 minutos a 3000 rpm. En el sobrenadante obtenido, se determinó la cantidad de glicerol liberado por la suspensión celular al medio de incubación utilizando el método fluorométrico de Davidson y Karjala (1970).



Este método se basa en la medida fluorométrica del  $\text{NADH}_2$  que se forma cuando el glicerol es oxidado por la enzima glicerol dehidrogenasa. Las experiencias fueron realizadas por duplicado.

Brevemente, 1 ml del sobrenadante ya desproteinizado, se incubó a temperatura ambiente por 90 minutos con una mezcla de reacción conteniendo 6 mg de  $\text{NAD}^+$  y 0,1 U de glicerol dehidrogenasa (1 unidad de glicerol dehidrogenasa oxida 1  $\mu\text{mol}$  de glicerol a dehidroxiacetona por min. a  $25^\circ\text{C}$  a pH 10) en un volumen total de 4 ml de buffer glicina 0,05 M, pH 9.5 (Davidson y Karjala, 1970). Se midió la fluorescencia producida por el  $\text{NADH}_2$  con filtros de excitación a 350 nm y de emisión a 465 nm.

### **III.3.7 Acción antilipolítica de la insulina**

En el estudio de la acción de la insulina sobre la lipólisis deben considerarse:

1- que la velocidad de lipólisis espontánea de los adipocitos provenientes del tejido epididimal de ratas normales es muy baja y por lo tanto es difícil detectar el efecto antilipolítico de la insulina. En consecuencia en experiencias donde se desea estudiar la acción antilipolítica de la hormona, es necesario estimular la lipólisis con agonistas  $\beta$  adrenérgicos para poder cuantificar la inhibición de la lipólisis mediada por la insulina (Green y Newsholme, 1979) (Reaven y col, 1989).

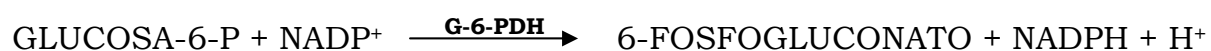
2- Además, de acuerdo con los trabajos de Hoffman y col (1981), Fredholm (1981) y Schwake y col (1975), la adenosina liberada espontáneamente por los adipocitos es un inhibidor potente y eficaz de la lipólisis. Para contrarrestar este efecto, se agrega al medio de incubación adenosina deaminasa, que convierte la adenosina en inosina. De esta manera, la presencia de la enzima asegura una concentración de adenosina baja y constante durante el período de incubación, permitiendo que las condiciones de ensayo sean realmente reproducibles (Green y Newsholme, 1979) (Reaven y col, 1989).



En base a lo expuesto, para determinar la actividad antilipolítica de la insulina, se llevaron a cabo ensayos en paralelo donde alícuotas de la suspensión de adipocitos fueron incubadas durante 1 hora a 37°C en buffer Krebs-Henseleit fosfato (pH: 7,4) adicionado de Ca<sup>+2</sup> 1,25 mM, glucosa 5,5 mM y albúmina sérica bovina (fracción V) esencialmente libre de ácidos grasos 40 mg/ml, isoproterenol 10<sup>-7</sup> M (Reaven y col, 1989) (Luo y col, 1992) y adenosina deaminasa 1U/ml (Reaven y col, 1989) (Londos y col, 1985) en ausencia o presencia de 1,7 nM de insulina. La incubación se realizó en un agitador metabólico (60 ciclos/minuto), bajo una atmósfera de O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95%:5%). Finalizado el tiempo de incubación, se extrajo una alícuota del medio infranadante libre de células grasas y se procedió a determinar el glicerol liberado por el método fluorométrico de Davidson y Karjala (1970) descripto en el ítem anterior.

### **III-3.8 Determinación de la actividad glucosa-6-fosfato dehidrogenasa:**

De acuerdo con lo descripto por Cohen y col. (1972), un trozo de tejido adiposo epididimal lavado con solución salina (NaCl 0,9%) fría (0-4°C), fue secado cuidadosamente y pesado. El tejido fue homogeneizado durante 2 minutos en baño de hielo, utilizando un homogeneizador de tipo Potter-Elvehjem previamente enfriado, en un medio compuesto por sacarosa 0,2 M; trietanolamina-HCl 20 mM pH=7,5; ditioneitol (DTT) 1 mM y EDTA disódico en una proporción 25% peso/volumen. El homogeneizado se centrifugó durante 20 minutos en una centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. La capa lipídica superior fue removida cuidadosamente y se procedió a cuantificar la actividad glucosa-6-fosfato dehidrogenasa en el extracto acuoso obtenido de acuerdo al método descripto por Löhr y Waller (1963) cuyo fundamento es el siguiente:





donde la velocidad de formación de NADPH a 340 nm, expresada en  $\mu\text{mol}/\text{minuto}$ , representa la actividad enzimática de la Glucosa-6-fosfato Dehidrogenasa

La actividad específica de la enzima fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica } (\mu\text{mol}/\text{min.mg de proteína}) = \frac{\Delta E}{\Delta t} \times \frac{V}{\varepsilon \times d \times v} \times C_{\text{proteínas}}^{-1}$$

donde:

$\Delta E/ \Delta t$  = variación de la extinción respecto del tiempo ( $\text{minuto}^{-1}$ )

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

$d$  = paso de luz (cm)

$V$  = volumen de ensayo (ml)

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

$C_{\text{proteínas}}$  = concentración de proteínas en el extracto analizado (mg/ml)

La concentración de proteínas en el extracto se determinó por el método propuesto por Lowry y col. (1951).

### **III-3.9 Determinación de la actividad lipoproteína lipasa en tejido adiposo:**

Se utilizó la técnica descrita por Hidalgo y col. (1994). Brevemente un trozo de tejido epididimal fue 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, y homogeneizado en un homogeneizador Potter-Elvehjen a dicha



temperatura. A una alícuota del homogeneizado se 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 mencionada anteriormente. El precipitado obtenido (polvo de acetona) fue llevado a sequedad bajo corriente de N<sub>2</sub> (1 hora a 4°C).

El polvo de acetona 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. Alícuotas de dicha suspensión fueron incubadas en un medio constituido por: trioleína (5,66 µmol/ml), lecitina (0,3mg/ml), albúmina sérica bovina (1g/100ml), buffer Tris-HCl pH=8 (172,4 mM), suero inactivado de rata (8,33%) durante 1 hora a 37°C, en un baño Dubnoff con agitación. Finalizado el período de incubación, la reacción es 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 Meinertz (1960). Los ácidos grasos liberados bajo las condiciones del ensayo se distribuyen en la fase superior no polar. Una alícuota de dicha fase es titulada con OHNa en presencia de azul de timol como solución indicadora, bajo corriente de N<sub>2</sub>. Concentraciones conocidas de ácido palmítico recristalizado y disuelto en heptano fueron utilizadas como estándar. La actividad lipoproteína lipasa (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).

### **III-3.10 Determinación de la actividad de la enzima sintetasa de ácidos grasos**

Un trozo de tejido adiposo fue homogeneizado a 0-4°C en un buffer conteniendo sacarosa 0,25 M, DTT 1mM y EDTA 1Mm, pH=7,4 y centrifugado a 100.000 x g durante 1 hora a 4°C para obtener la fracción citosólica. La actividad enzimática de la sintetasa de ácidos grasos (FAS) fue



determinada inmediatamente a través de la oxidación de NADPH dependiente de malonil-CoA a 37°C de acuerdo a la técnica descrita por Agheli y col (1998). El medio de reacción utilizado fue: fosfato de potasio 100mM, pH=7,0, EDTA 100  $\mu$ M, DTT 1 mM, NADPH 125  $\mu$ M, acetil-CoA 25  $\mu$ M y malonil-CoA 50  $\mu$ M.

Una unidad de actividad enzimática representa 1  $\mu$ M de NADPH oxidado por minuto a 37°C. Los resultados se expresaron como mU/g tejido adiposo y como mU/mg proteína.

### **III-3.11 Determinación de la actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC)**

El método utilizado, descrito por Halestrap y Denton (1973), se basa en la incorporación del ( $^{14}$ C) bicarbonato en malonil-CoA. Brevemente, la extracción de la enzima se realizó homogeneizando el tejido adiposo a 0-4°C con un buffer fosfato de potasio 100 mM pH=7,3, conteniendo EDTA 2 mM y glutation reducido (GSH) 5 mM. El homogeneizado fue inmediatamente centrifugando a 1500 x g por 1 minuto para remover la grasa y los detritos celulares.

En el infranadante removido con una jeringa se cuantificó la actividad enzimática. A los 5 minutos de realizada la extracción se cuantificó la actividad inicial de la acetil-CoA carboxilasa. Para obtener la actividad total, se incubó previamente una alícuota del infranadante con citrato de potasio 20 mM a 30°C por 30 minutos.

El ensayo se inició agregando 50  $\mu$ l del infranadante a 0,45 ml de un medio conteniendo tris HCl 100 mM pH=7,4, ATP 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 0,5 mM, GSH 1 mM, KH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> 15 mM (radioactividad específica





aproximada: 0,4  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) y acetil-CoA 0,15 mM. Se incubó 3 minutos a 30°C y se detuvo la reacción mediante el agregado de 0,1 ml HCl 5M. Una alícuota de 0,4 ml se evaporó hasta sequedad en un vial de centelleo a 85°C. El residuo se disolvió en agua (0,2 ml) y se midió la radioactividad en un contador de centelleo.

Los resultados se expresaron como mU/mg proteína, mU/g tejido húmedo, mU/10<sup>6</sup> células y mU/órgano total.

### III-3.12 Determinación de la actividad de la enzima málica (ME)

Se utilizó el método de Wise y Ball (1964). Brevemente, el tejido adiposo (20% peso/vol) fue homogeneizado a 0-4°C en una solución de sacarosa 0.25 M y luego centrifugado a 40.000 x g durante 10 minutos a 0-3°C. La actividad enzimática se determinó midiendo la formación de NADPH en el sobrenadante acuoso a 340 nm y a 37°C según:



Los cambios de absorbancia se midieron durante 15-75 segundos luego de la adición del malato. Los resultados fueron expresados como mU/g tejido húmedo y como mU/mg proteína.

### III-3.13 Captación de glucosa por el adipocito

Dos análogos de glucosa diferentes se utilizan para medir su captación en adipocitos. La 2-D-glucosa es captada y fosforilada por las células mientras que la 3-O-metilglucosa también es captada pero no puede seguir siendo metabolizada, de manera que rápidamente su concentración se equilibra a través de la membrana celular. Se ha establecido que en el adipocito, 2-D-glucosa y 3-O-metilglucosa son captadas por el mismo sistema de transportadores (Olefsky, 1978).

En el presente trabajo de tesis se cuantificó la captación de glucosa por los adipocitos utilizando la 3-O-metilglucosa marcada. Los adipocitos



fueron aislados según la técnica de Rodbell previamente descripta en el ítem III-3.1.

Se incubaron 50  $\mu$ l de la suspensión celular a 37°C con 20  $\mu$ l de una mezcla de 3-O-metilglucosa marcada (concentración final: 0,1 mM, 0,2  $\mu$ Ci/ml) y glucosa no marcada. La captación es terminada a los 2-4 segundos agregando 400  $\mu$ l de phloretin 0,1 mM. Posteriormente, una alícuota de 400  $\mu$ l de ésta mezcla, se colocó sobre 100  $\mu$ l de aceite de silicona, contenidos en tubos de centrifuga eppendorf, para ser centrifugados por 30 segundos. La capa celular, que luego de la centrifugación se halla sobre la capa de aceite de silicona, se coloca en viales de centelleo para medir su radioactividad.

En las experiencias en donde se estudió el efecto estimulante de la insulina, las células se preincubaron con una concentración máxima efectiva de insulina (10nM) por 30 minutos a 37°C. La cantidad de azúcar atrapada en el espacio extracelular se determinó usando ( $^3$ H) inulina, siendo éste factor sustraído del valor de captación total para poder determinar sólo la captación mediada por trasportadores (Ciaraldi, 1989).

### **III-3.14 Ob ARNm y adiponectina ARNm**

#### *Preparación del ARN total:*

El ARN total del tejido adiposo se extrajo a partir de homogeneizados de muestras del tejido graso de acuerdo a las instrucciones del kit comercial RNA plus kit (Bioprobe system, Montreuil Sous-Bois, France). La concentración de ARN de cada muestra se calculó a partir de la medida de absorbancia y su pureza a través de la relación 260/280. Las muestras de ARN total fueron conservadas a -80°C hasta la cuantificación de los mRNAs correspondientes.

#### *Real-time RT-PCR:*



Para la cuantificación relativa de mRNAs se realizó un ensayo de Real-time, two-step RT-PCR. Los primers específicos fueron diseñados por TIB Mol-Biol Syntheselabor (Berlín, Alemania). Las secuencias específicas para primers y sondas de ratas usadas, fueron las siguientes: ob forward, ATTTCACACAAgCAGTCggTAT; ob reverse, gAAGCCCgggAATgAAgT; sonda ob, 6FAM-CgCCAaggCAGAgggTCACCg XT-PH; adiponectin (APM) forward, CCAAggAAACTTgTgCaggTT, APM reverse, CgCTCCTgTCATTCCAgCA, sonda APM, 6FAM-ATACCgggCCgTgATggCAGAgAT—TMR

El cDNA fue sintetizado a partir de 1 µg de RNA total de tejido adiposo en 10 µl de volumen de reacción usando random hexámeros y transcriptasa reversa de origen murino (murine Maloney virus – M-MLV), de acuerdo al M-MLV first strand cDNA synthesis system protocol (Invitrogen Life Technology, Cergy Pontoise, France). Usando un instrumento Light-Cycler (Roche, Indianapolis, IN), el ADNc fue amplificado con una sonda TaqMan en un capilar de vidrio con un volumen final de 10 µl de mezcla de reacción conteniendo 2,5 µl de cDNA, 1X de sondas LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization (Roche Diagnostics, Meylan, France), 1 µM de primers forward y reverse, 0,2 µM de la sonda específica y 3 mM de MgCl<sub>2</sub>. La PCR se realizó en 40 ciclos con 480 segundos a 95°C (desnaturalización), 10 segundos a 95°C seguido de 40 segundos a 60°C (amplificación) y 60 segundos a 60°C (elongación). La especificidad de la amplificación se determinó por el análisis de las curvas de fusión y la amplificación tanto de adiponectina como de leptina mostraron sólo un pico en el análisis.

La cuantificación del rRNA 18S se realizó para normalizar las muestras. rRNA 18S se cuantificó utilizando también una sonda TaqMan. Brevemente, 10 µl de mezcla para PCR conteniendo 2,5 µl de cDNA, 1X de sondas LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization (Roche Diagnostics, Meylan, France), 1X 18S primers y mezcla de sondas (n° 4333760F, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) y 3 mM de MgCl<sub>2</sub>. La PCR se realizó en 40



ciclos con 10 segundos a 95°C (desnaturalización), y 40 segundos a 60°C (amplificación y elongación).

Un pool de RNA total de tejido adiposo de diferentes grupos experimentales se usó para realizar la curva estándar. Resumiendo, luego de la transcripción reversa, al cDNA se le realizó una dilución serial entre  $10^{-1}$  y  $10^{-6}$ , las cuales se amplificaron junto con la muestra. Ploteando, en unidades arbitrarias, las diluciones seriales, se obtuvieron datos cuantitativos de las muestras con un software LightCycler. La curva estándar también se usó para evaluar la eficiencia de la PCR examinando la pendiente la cual era constantemente  $-3.3$  para cada gen en estudio. Cada cDNA se cuantificó por duplicado y algunas veces por triplicado para incrementar la exactitud. El valor promedio para cada muestra fue usado para la cuantificación. Las variaciones en las medidas para un gen determinado en cada muestra generalmente eran de 1-10%. Los datos cuantitativos-relativos se expresaron como el cociente entre el nivel de mRNA para adiponectina o leptina y el nivel de rRNA 18S en unidades arbitrarias (Rossi y col, 2005).

#### **III-4 Análisis de la composición de la carcasa:**

Seis ratas de cada grupo dietario, anestesiadas 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 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 en alícuotas de las mismas almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### *III-4.1 Determinación del contenido de agua.*

La determinación de agua se efectuó inmediatamente luego de la trituración de las carcasas. Para ello se deshidrataron alícuotas de



aproximadamente 10g en una estufa de secado a 75-80 °C durante 24 horas (hasta peso constante). El contenido acuoso de la muestra se obtuvo por diferencia de peso de la muestra (Cunniff, 1999).

#### *III-4.2 Determinación del contenido de grasa.*

La determinación de grasa extraíble con éter se efectuó sobre alícuotas de carcasa previamente deshidratadas. Para la extracción se utilizó un equipo Twysselman utilizando como solvente éter de petróleo (Cunniff, 1999).

#### *III-4.3 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 (Cunniff, 1999). El contenido de proteínas se estimó multiplicando el contenido de nitrógeno de la muestra por 6,25.

#### *III-4.4 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 (Cunniff, 1999).

### **III-5 Secreción de insulina en perfusión de islotes pancreáticos aislados frente al estímulo de la glucosa.**

Los islotes pancreáticos de animales ayunados por 12 horas, fueron aislados por digestión con colagenasa y colectados bajo microscopio estereoscópico (Lacy y Kostianovsky, 1967). 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  $\mu$ m. Los islotes fueron perfundidos de acuerdo a la técnica de Burr y col (1969) con KRB conteniendo: glucosa 3



mM, albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos 250 mg/l, dextrán-70 40mg/l a pH 7,4 y 37°C, constantemente gasificado con una mezcla O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5) 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 y posteriormente el KRB fue adicionado de glucosa 16,5 mM hasta el final del período de perfusión (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 finalizar la perfusión. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta la determinación de los niveles de insulina inmunorreactiva como se describió anteriormente.

#### **IV- Reactivos utilizados:**

Los reactivos enzimáticos, sustratos y coenzimas utilizados en las técnicas previamente detalladas fueron provistos por SIGMA (St. Louis, Mo., USA) o Boehringer Mannheim (Indianapolis, Ind., USA). Los reactivos radiactivos fueron provistos por Amersham Biosciences. Los demás reactivos químicos son de grado analítico (máxima pureza disponible comercialmente).

#### **V- Análisis estadístico de los datos experimentales:**

Los resultados experimentales se expresan como media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas entre los grupos se realizaron transversalmente entre los distintos grupos dietarios en cada período del estudio (210 días y luego hasta los 270 días). Las diferencias estadísticas entre los grupos se determinaron por ANOVA (análisis de varianza), con un factor (dieta), seguidas de la inspección de las diferencias entre pares de medias por el test de Newman Keuls o Scheffe's (Snedecor y Cochran, 1967). Valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. En todos los casos, los coeficientes de correlación intraclase fueron de al menos 0,73.



## **RESULTADOS EXPERIMENTALES**

### **Parte I**

Como mencionáramos en el capítulo “Introducción”, ratas normales alimentadas crónicamente con una dieta rica en sacarosa (DRS) desarrollan dislipidemia, moderada hiperglucemia y resistencia insulínica. Estas alteraciones se acompañan de un incremento de la ingesta calórica que se refleja en un incremento del peso corporal y del tejido adiposo visceral (Chicco y col, 2000).

Los ácidos grasos n-3 de origen marino tienen efecto hipolipemiante y numerosos autores (Harris y col, 1997) (Mori y col, 2000) (Storlien y col, 1998) han señalado a nivel experimental su acción beneficiosa en situaciones de dislipidemia y resistencia insulínica.

En función a lo expuesto analizamos primeramente el efecto de la administración de ácidos grasos n-3 sobre parámetros plasmáticos, incremento de peso, adiposidad y resistencia insulínica periférica global.



Es por ello que en las experiencias realizadas se utilizaron tres grupos experimentales:

-Grupo Control (DC): recibió una dieta semisintética (%p/p: almidón 62.5, proteína 17, aceite de maíz (AM) 8) durante 270 días.

-Grupo Experimental: fue alimentado con la misma dieta semisintética con la única modificación en la fuente de hidratos de carbono: la sacarosa reemplazó al almidón (62,5 % p/p) (DRS) durante 210 días. Al cabo de este tiempo, el grupo experimental fue dividido al azar en dos subgrupos: uno de ellos continuó hasta el día 270 con la DRS mientras que en el otro se sustituyó durante 60 días la fuente grasa (8% p/p Aceite de maíz por 7% p/p aceite de hígado de bacalao (AHB) + 1% p/p AM (DRS + AHB)).

Más detalles de los grupos de animales y componentes de las dietas fueron descriptos en el capítulo “Materiales y Métodos”.

Los resultados alcanzados son:

### **1- Peso corporal e ingesta calórica**

El peso corporal y la ingesta calórica fueron monitoreados cuidadosamente en todos los grupos de ratas a lo largo del período experimental. La **tabla 3** muestra el peso corporal (en gramos) al inicio y al final de la experiencia, y la ingesta calórica (kJ/día) de las ratas alimentadas con las distintas dietas experimentales. Como puede observarse, las diferentes dietas fueron aceptadas y asimiladas por los animales en forma adecuada.

Los cambios en el peso corporal generalmente se correlacionan con una mayor ingesta calórica. Durante los primeros 90 días de dieta, la ingesta calórica no presentó diferencias significativas entre los lotes y los incrementos de peso tuvieron comportamientos similares entre los grupos





control y experimentales (datos no mostrados). Sin embargo, a partir del tercer mes, en el lote experimental DRS se observó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) del peso corporal que alcanzó aproximadamente al 16%-18% y de la ingesta calórica (aproximadamente 20%) comparado con las ratas alimentadas con DC. Estos resultados corroboran datos anteriormente publicados (Chicco y col, 2000) (Chicco y col, 2003) (Soria y col, 2001).

Durante los últimos 60 días de experimentación el grupo DRS + AHB presentó una moderada reducción en la ganancia de peso corporal respecto a los otros dos grupos experimentales. Simultáneamente se observó un incremento ligeramente menor (no significativo) en la ingesta calórica respecto al grupo DRS.

**Tabla 3:** Peso corporal, ingesta calórica y ganancia de peso de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB).<sup>1</sup>

Dieta	Peso corporal inicial	Peso Corporal 210d	Ingesta calórica (1 a 210d)	Dieta	Peso corporal 270d	Ganancia peso (210 a 270d)	Ingesta calórica (210 a 270d)
	g	g	kJ/día		g	g	kJ/día
<b>DC (8)</b>	183,2±6,1 <sup>a</sup>	408,2±20,1 <sup>b</sup>	280,2±17,4 <sup>b</sup>	<b>DC (8)</b>	442,5±10,2 <sup>b</sup>	33,2±4,8 <sup>b</sup>	278,6±10,4 <sup>b</sup>
<b>DRS (16)</b>	187,5±7,5 <sup>a</sup>	475,4±9,8 <sup>a</sup>	347,5±18,6 <sup>a</sup>	<b>DRS (8)</b>	513,1±19,8 <sup>a</sup>	31,0±4,7 <sup>a</sup>	345,2±19,5 <sup>a</sup>
				<b>DRS+ AHB (8)</b>	487,3± 7,0 <sup>a</sup>	16,3±4,9 <sup>a</sup>	330,0±11,2 <sup>a</sup>



<sup>1</sup> Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. Los números entre paréntesis indican el número de animales utilizados en cada grupo experimental. Los valores en cada columna que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

<sup>2</sup> El grupo DRS + AHB consumió DRS por 210 días (fuente grasa aceite de maíz AM), sustituyéndose parcialmente AM por AHB durante los últimos 60 días de la experiencia.



---

## 2- Metabolitos y niveles de insulina plasmáticos

En la **tabla 4** se observa, al final del período de oscuridad, un incremento significativo de los niveles de triglicéridos, ácidos grasos y glucosa sin modificaciones de la insulina plasmática en ratas alimentadas crónicamente (270 días) con DRS comparadas con las del grupo DC.

La administración de AHB normalizó estos parámetros (**tabla 4**).



**Tabla 4:** Parámetros plasmáticos en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) al final del período experimental<sup>1</sup>

<b>Dieta</b>	<b>Triglicéridos</b> mmol/L	<b>Ácidos grasos libres</b> μmol/L	<b>Glucosa</b> mmol/L	<b>Insulina</b> pmol/L
<b>DC</b>	0,55 ± 0,04 <sup>b</sup>	294,5 ± 17,4 <sup>b</sup>	6,30 ± 0,25 <sup>b</sup>	375 ± 30 <sup>a</sup>
<b>DRS</b>	2,18 ± 0,07 <sup>a</sup>	887,2 ± 20,0 <sup>a</sup>	8,16 ± 0,09 <sup>a</sup>	369 ± 33 <sup>a</sup>
<b>DRS +AHB</b>	0,53 ± 0,06 <sup>b</sup>	280,5 ± 38,2 <sup>b</sup>	6,54 ± 0,21 <sup>b</sup>	370 ± 27 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Los valores se expresan como media ± SEM, al menos 6 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. Los valores en cada columnas que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.



### **3- Peso de tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal**

El aumento del peso corporal y de la ingesta energética constatado en los animales alimentados con DRS, se correlacionan positivamente con un incremento del peso de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal. La **tabla 5** muestra que al final del período experimental, el peso del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal (absoluto y relativo) del grupo DRS incrementó significativamente respecto al grupo DC. La administración de AHB disminuyó sensiblemente ( $p < 0.05$ ) el peso de ambos tejidos sin alcanzar aún los valores obtenidos en el grupo control.

### **4- Composición de carcasa**

La composición de la dieta puede influenciar el peso corporal y la composición de la carcasa (Suzuki y col, 1975). En la **tabla 6** observamos la composición de la carcasa de los animales de los distintos grupos experimentales. Las ratas alimentadas con DRS durante 270 días, presentan un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) del peso y del contenido de grasa de la carcasa y una disminución del contenido de agua de la misma.

Cuando el aceite de pescado reemplazó parcialmente al aceite de maíz como fuente grasa dietaria, el peso de la carcasa disminuyó ligeramente respecto al grupo DC, incrementándose el contenido de agua que alcanzó valores comparables a los del grupo DC. Más aún, el contenido de grasa bajó significativamente ( $p < 0.05$ ) aunque los valores permanecieron aún más elevados que los observados en el grupo DC.

El resto de los componentes analizados (proteínas y cenizas) no presentaron diferencias significativas entre los diferentes grupos dietarios.



**Tabla 5:** Peso del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) al final del período experimental.<sup>1</sup>

	DC	DRS	DRS + AHB
<b>Tejido adiposo epididimal</b>			
Peso total (g)	7,30 ± 0,79 <sup>c</sup>	16,91 ± 0,91 <sup>a</sup>	11,80 ± 0,80 <sup>b</sup>
Peso relativo (g/100g peso corporal)	1,67 ± 0,18 <sup>c</sup>	3,29 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,16 <sup>b</sup>
<b>Tejido adiposo retroperitoneal</b>			
Peso total (g)	6,30 ± 0,51 <sup>c</sup>	16,00 ± 1,08 <sup>a</sup>	11,20 ± 1,19 <sup>b</sup>
Peso relativo (g/100g peso corporal)	1,42 ± 0,11 <sup>c</sup>	3,12 ± 0,21 <sup>a</sup>	2,29 ± 0,18 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Los valores se expresan como media ± SEM, al menos 8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ), cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.



**Tabla 6:** Composición de carcasa de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) al final del período experimental.<sup>1</sup>

	<b>DC</b>	<b>DRS</b>	<b>DRS + AHB</b>
<b>Carcasa</b> (g)	339,1 ± 5,9 <sup>b</sup>	410,0 ± 19,9 <sup>a</sup>	368,1 ± 11,5 <sup>a</sup>
<b>Proteínas</b> (% peso húmedo)	20,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	19,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	19,2 ± 0,5 <sup>a</sup>
(g)	69,9 ± 2,8 <sup>a</sup>	76,5 ± 3,4 <sup>a</sup>	70,2 ± 1,8 <sup>a</sup>
<b>Grasa</b> (% peso húmedo)	13,1 ± 0,5 <sup>c</sup>	24,6 ± 1,7 <sup>a</sup>	19,0 ± 1,4 <sup>b</sup>
(g)	44,5 ± 3,3 <sup>c</sup>	102,3 ± 9,9 <sup>a</sup>	69,8 ± 7,4 <sup>b</sup>
<b>Agua</b> (% peso húmedo)	60,2 ± 1,8 <sup>a</sup>	54,5 ± 1,4 <sup>b</sup>	58,4 ± 0,9 <sup>a</sup>
(g)	203,0 ± 5,6 <sup>a</sup>	214,0 ± 6,4 <sup>a</sup>	214,0 ± 4,4 <sup>a</sup>
<b>Cenizas</b> (% peso húmedo)	4,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
(g)	14,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	14,5 ± 1,4 <sup>a</sup>	13,4 ± 0,2 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Los valores se expresan como media ± SEM, al menos 8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ), cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.



## **5- Estudio de la sensibilidad insulínica periférica global: Velocidad de Infusión de Glucosa (VIG).**

Al finalizar el período experimental, se realizó una clamp euglucémica-hiperinsulinémica en animales pertenecientes a los tres grupos dietarios, a fin de evaluar la sensibilidad insulínica periférica global como medida de la resistencia insulínica.

Como se describiera previamente en “Materiales y Métodos”, luego de 5 horas de ayuno, los niveles de glucemias postprandiales (preclamp) fueron: (mmol/l; media  $\pm$  SEM; n = 8): DC:  $5,61 \pm 0,29$ ; DRS:  $8,12 \pm 0,30$ ; DRS + AHB:  $6,01 \pm 0,21$ ).

Los niveles plasmáticos de insulina obtenidos en estas condiciones fueron similares a aquellos observados al final del período de oscuridad (basales) (datos no mostrados).

La glucemia fue clampeada a 5,5-6,0 mmol/l. La VIG obtenida en el estado estacionario fue significativamente inferior ( $p < 0,01$ ) en los animales alimentados con DRS en comparación con aquellos de igual sexo y edad alimentados con DC (**Figura 4**). Estos resultados demuestran un importante deterioro de la sensibilidad insulínica periférica global con la cronicidad de la dieta.

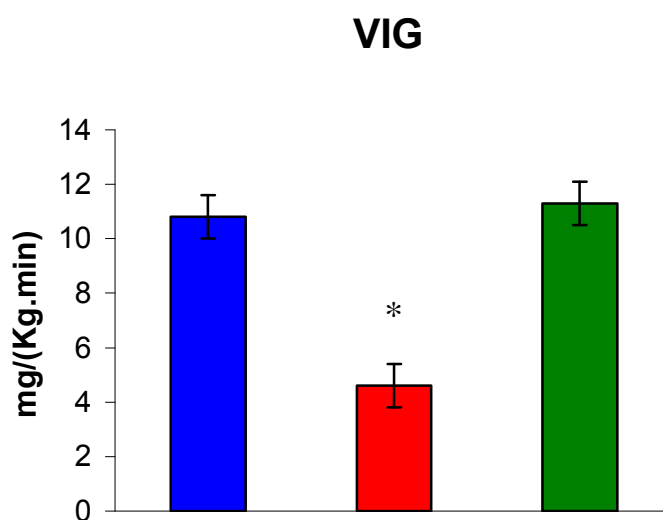
La sensibilidad insulínica periférica global se normalizó, observándose valores de VIG comparables a los obtenidos para el grupo DC cuando el aceite de pescado reemplazó parcialmente al aceite de maíz como fuente de grasa dietaria.

No se observaron cambios significativos en el hematocrito de los animales de los tres grupos experimentales durante el transcurso de la clamp.





**Figura 4:** Velocidad de infusión de glucosa (VIG) en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) al final del período experimental.<sup>1</sup>



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

<sup>1</sup> Los valores se expresan como media ± SEM. Al menos 5 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. \*p<0.01 DRS vs. DC y DRS + AHB. **Glucosa e Insulina:** Los valores representan los niveles alcanzados en el estado estacionario durante los últimos 60 minutos de la clamp euglicémica hiperinsulinémica.



Estos resultados demuestran que una dieta rica en sacarosa administrada por un período prolongado de tiempo (270 días) a ratas Wistar machos normales induce importantes alteraciones a nivel metabólico-hormonal. En términos generales se observa: dislipidemia (elevados niveles plasmáticos de triglicéridos y ácidos grasos) moderada hiperglucemia y pronunciada resistencia insulínica periférica global (disminución del VIG), resultados que confirman estudios previos del grupo (Chicco y col, 2003). Por otra parte pudimos constatar que estas alteraciones se acompañan de un moderado incremento de la ingesta calórica y del peso corporal (aproximadamente 18%) que se correlaciona con un significativo aumento del peso de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal como también de un mayor contenido lipídico de la carcasa.

Sustituyéndose isocalóricamente la fuente de grasa dietaria (aceite de maíz rico en ácidos grasos n-6, por aceite de hígado de bacalao rico en ácidos grasos n-3) durante los últimos 60 días de experimentación, el perfil lipídico y los niveles de glucemia plasmáticos alcanzan los valores observados en los animales controles de igual sexo y edad, sin experimentar modificaciones en los niveles plasmáticos de insulina. La resistencia insulínica periférica global también logra normalizarse en este grupo experimental DRS + AHB. Si bien la ingesta calórica y el peso corporal fueron significativamente superiores a los del grupo control, estos parámetros mostraron una moderada reducción respecto al grupo DRS. Con respecto a los valores correspondientes tanto al peso del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal como al contenido graso de la carcasa, estos mostraron una reducción significativa respecto al grupo DRS aunque continuaron siendo superiores a los obtenidos para el grupo control (DC).



La resistencia insulínica junto con la dislipidemia, hipertensión y Diabetes Mellitus tipo 2, entre otras anormalidades metabólicas, constituyen el llamado Síndrome X o Síndrome Plurimetabólico. La obesidad es un componente importante de este síndrome cuya prevalencia en la población mundial constituye un importante desafío en materia de salud en el siglo XXI.

El incremento de la masa grasa (particularmente de la adiposidad visceral) puede ser el resultado de una hipertrofia y/o hiperplasia de las células adiposas.

Diversos factores genéticos y ambientales (Ej.: nutrición, sedentarismo) pueden determinar cambios en el tamaño y/o número de los adipocitos conduciendo en consecuencia a alteraciones morfológicas del tejido adiposo. Entre los factores no genéticos, la dieta desempeña un rol muy importante.

Dado que la movilización de lípidos a partir del tejido adiposo como su interacción con el entorno metabólico-hormonal están influenciados por el tamaño de los adipocitos (Holm y col, 1975) (Östman y col, 1973), se propuso analizar aspectos morfológicos del tejido adiposo epididimal de ratas insulino-resistentes que, como demostramos anteriormente, presentan un aumento significativo de la adiposidad visceral como consecuencia de la ingesta prolongada de una dieta rica en sacarosa (DRS). Esto nos permitiría conocer la participación del tejido adiposo en la resistencia insulínica global presente en este modelo.

En este contexto, los objetivos propuestos fueron:



a) determinar en el tejido adiposo epididimal el número y volumen celular como así también el contenido de triglicéridos y la distribución de los adipocitos aislados de animales alimentados crónicamente con DRS y

b) evaluar si una vez establecida la dislipidemia y resistencia insulínica, la sustitución parcial del aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao (rico en ácidos grasos n-3) como fuente de grasa dietaria podría mejorar y/o revertir las posibles alteraciones morfológicas producidas por la ingesta prolongada de DRS en dicho tejido. Esta hipótesis se fundamenta en los resultados obtenidos anteriormente donde se observa la capacidad de los ácidos grasos polinosaturados n-3 de normalizar la dislipidemia y la anormal homeostasis de la glucosa (Lombardo y col, 1996 b).

Para lograr estos objetivos utilizamos los siguientes grupos de animales:

-Grupo Control (DC): recibió una dieta semisintética cuya fuente de hidratos de carbono fue almidón (62,5 % p/p) y la fuente de grasa de la dieta fue aceite de maíz (AM 8% p/p) durante todo el período experimental (270 días).

-Grupo Experimental: fue alimentado con la misma dieta semisintética con la única modificación en la fuente de hidratos de carbono: la sacarosa reemplazó al almidón (62,5 % p/p) (DRS) durante 210 días. Al cabo de este tiempo, el grupo experimental fue dividido al azar en dos subgrupos: uno de ellos continuó hasta el día 270 con la DRS (8% p/p de aceite de maíz (AM)), mientras que el otro subgrupo recibió la DRS sustituyéndose la fuente de grasa dietaria, 8 % p/p de AM por 7 % p/p aceite de hígado de bacalao (AHB) + 1 % p/p de AM (DRS + AHB) hasta finalizar el período experimental (270 días).

Una vez finalizado el período de ingesta, los animales de todos los grupos experimentales fueron sacrificados y se extrajeron muestras de tejido adiposo epididimal. Los adipocitos fueron aislados utilizando el método de



Rodbell (1964) para luego determinar el volumen, contenido de triglicéridos e histograma de distribución celular de acuerdo a lo previamente descrito en “Materiales y Métodos”.

Los resultados alcanzados son:

## **6- Aspectos morfológicos del tejido adiposo epididimal**

En la **tabla 7** se observa que el volumen de los adipocitos del tejido epididimal así como su contenido en triglicéridos (índice del tamaño celular) es significativamente superior en el grupo DRS respecto al grupo control (DC). El número de células adiposas expresadas por gramo de tejido en el grupo DRS es también significativamente menor ( $p < 0,05$ ), resultados que demuestran una hipertrofia de las células adiposas en este grupo experimental.

La presencia del AHB en la dieta disminuyó significativamente la hipertrofia de los adipocitos observándose un menor volumen celular y un menor contenido de triglicéridos, así como también una reducción del peso total del tejido adiposo epididimal respecto al grupo DRS. Sin embargo, estos valores son aún significativamente mayores a los observados en el lote alimentado con DC.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos respecto al número total de células adiposas expresadas por peso total del tejido. Los valores obtenidos son (media  $\pm$  SEM): DC:  $29,40 \pm 1,51$ ; DRS:  $32,25 \pm 1,22$ ; DRS + AHB:  $33,45 \pm 1,56$ .

Estos hallazgos demuestran que la dieta rica en sacarosa, en las condiciones experimentales utilizadas, induce una hipertrofia del tejido adiposo epididimal en ratas Wistar normales.

## **7- Histograma de distribución de diámetros celulares**



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

Los diámetros de los adipocitos se distribuyen en forma gaussiana en los tres grupos dietarios estudiados, aunque se observaron poblaciones diferentes para cada uno de ellos.

En el grupo DRS existe un claro desplazamiento de los diámetros celulares hacia la derecha con un incremento significativo (40%) del diámetro celular medio y una mayor heterogeneidad de la población celular comparado con los animales que recibieron la dieta DC.

La administración de AHB como fuente principal de grasa dietaria condujo a una significativa reducción del diámetro celular medio, con un histograma de distribución celular que se aproxima al del grupo DC.



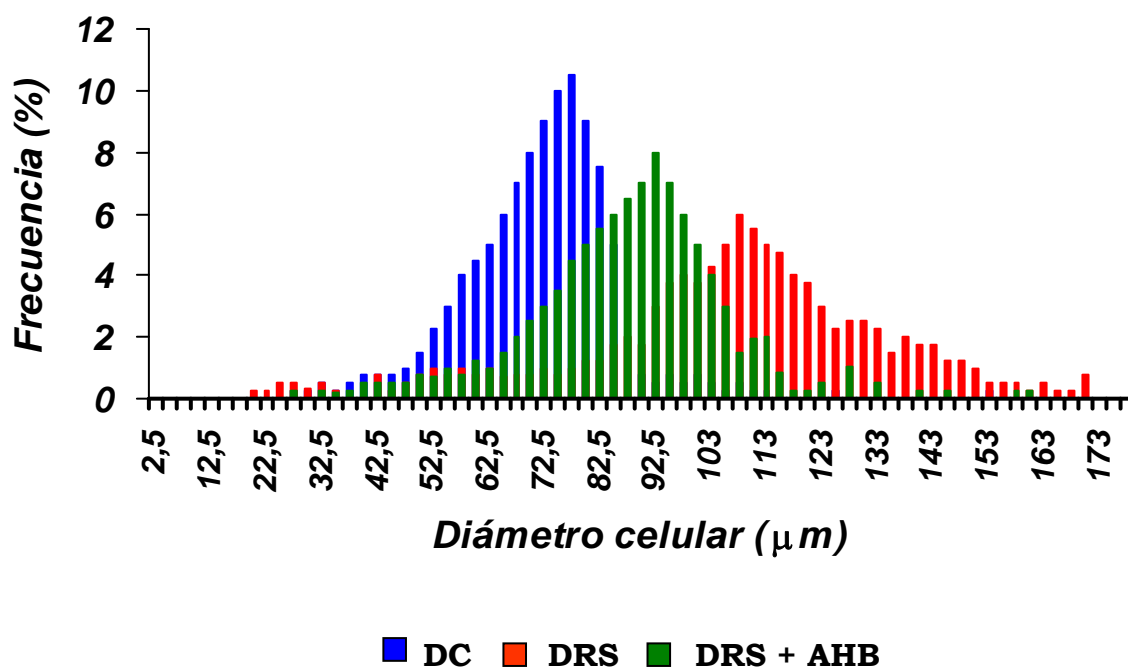
**Tabla 7:** Peso total, volumen celular y contenido de triglicéridos de adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) al final del período experimental.<sup>1</sup>

	<b>DC</b>	<b>DRS</b>	<b>DRS + AHB</b>
Peso total (g)	7,35 ± 0,79 <sup>c</sup>	14,40 ± 0,92 <sup>a</sup>	10,83 ± 0,44 <sup>b</sup>
Volumen celular (pl)	263,5 ± 16,6 <sup>c</sup>	497,2 ± 11,2 <sup>a</sup>	358,5 ± 20,3 <sup>b</sup>
n° células x 10 <sup>6</sup> /g tejido	4,00 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,24 ± 0,15 <sup>c</sup>	3,09 ± 0,12 <sup>b</sup>
Triglicéridos (μmol/célula)	0,30 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,59 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,02 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Los valores se expresan como media ± SEM, al menos 8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ), cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.



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



<sup>1</sup> Las columnas representan el porcentaje promedio de células medidas que corresponden al intervalo de clase indicado. Se procesaron al menos 8 animales en cada uno de los grupos experimentales.





## **Discusión Parte I**

La administración prolongada (270 días) de una dieta rica en sacarosa (DRS) a ratas Wistar machos normales produce, en tejido adiposo epididimal, una clara alteración de la distribución celular con un aumento significativo del tamaño de los adipocitos que se visualiza en un incremento del volumen celular medio (VCM) y del contenido de triglicéridos en la célula. Estos hallazgos se corresponden con un aumento significativo de la ingesta calórica, peso corporal, peso de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal y contenido lipídico de la carcasa, respecto de animales de igual sexo y edad que ingirieron una dieta control (DC) durante el mismo período de tiempo.

La sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria de aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao (AHB) durante los últimos 60 días de experiencia (grupo DRS + AHB), indujo una disminución significativa en la adiposidad visceral y en el contenido graso de la carcasa. Se observó así, una reducción de la hipertrofia de los adipocitos epididimales asociada a una distribución del tamaño celular que se aproxima a la observada en animales alimentados con DC. Todos estos hallazgos se acompañan de una normalización en los niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres plasmáticos, homeostasis de la glucosa y resistencia insulínica periférica global, alteraciones todas ellas presentes en el grupo de animales alimentados crónicamente con DRS.

Varios autores han estudiado la influencia de la administración de una DRS sobre el peso corporal y los depósitos grasos, aunque estos estudios dejan ver que la respuesta a la administración de sacarosa depende de la especie del roedor utilizado, de la edad del mismo y del tiempo de



administración de la dieta. Así es como ratas Osborne-Mendel responden con acumulación de grasa y ganancia de peso, mientras que en las ratas S 5B/PI, la sacarosa induce una pérdida de peso (Schemmel y col, 1982).

Un incremento en el peso corporal acompañado de un mayor depósito de grasa visceral fue observado por Blazquez y López-Quijada (1964) en ratas Wistar alimentadas desde el final de la lactancia y por 30 días con una dieta rica en sacarosa (68 % p/p). Kanarek y Orthen-Gambill (1982) también observaron que la adición de azúcares simples (fructosa y/o sacarosa 32% p/v) durante 50 días al agua de bebida de ratas jóvenes adultas Sprague-Dawley, conducía a un incremento del peso corporal y del tejido adiposo retroperitoneal. Rizkalla y col (1990), administrando durante 10 semanas una dieta rica en fructosa, también observaron un incremento del peso del tejido adiposo epididimal en estos animales.

Por su parte, Newby y col (1990) demostraron, en ratas Wistar normales estudiadas desde el mes y medio hasta los 24 meses de vida, una correlación lineal entre el peso del tejido adiposo epididimal y el peso corporal y entre el incremento de la grasa corporal y el peso del tejido adiposo retroperitoneal.

Nuestro grupo de trabajo (Soria y col, 2001) ha observado que administrando una DRS por un período corto de tiempo (21 días) a ratas macho Wistar normales, el peso corporal y el del tejido adiposo epididimal, junto con el tamaño y distribución celular de los adipocitos, fueron comparables a los del grupo control. En la presente experiencia, luego de 270 días de dieta, observamos que la masa del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal aumentó de acuerdo al incremento del peso corporal, siendo este aumento significativo respecto del grupo control (DC).

El incremento de la adiposidad junto a una alterada distribución celular, demuestran la presencia de hipertrofia celular en los animales del



grupo DRS. Una distribución celular similar fue observada en humanos adultos obesos por Salans y col (1968).

En general, los cambios en la masa del tejido adiposo pueden ser atribuidos a la diferencia entre ingesta calórica y gasto energético. El mayor aporte energético observado en estos animales podría jugar un papel importante en el desarrollo de la adiposidad y en el incremento del peso corporal total.

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 hidratos de carbono durante 14 días, conduce a un incremento en el contenido graso de la carcasa en ratas hembras normales. De acuerdo con estos resultados, observamos que la ingesta prolongada de una DRS condujo también a un aumento del contenido graso de la carcasa con disminución del contenido de agua de la misma.

Si bien el tejido adiposo representa solo una pequeña fracción de la utilización global de la glucosa en el organismo, es un tejido target en la provisión de ácidos grasos hacia otros tejidos no adiposos sensibles a la acción insulínica. Los elevados niveles de ácidos grasos observados en este modelo podrían ejercer un efecto modulador de la acción insulínica periférica global contribuyendo indudablemente a la resistencia insulínica observada en los animales con DRS. Al respecto, Cooney y col (2002) observaron en modelos animales de resistencia insulínica (dietas ricas en grasa, infusión de lípidos o de glucosa) la presencia de altos niveles de ácidos grasos plasmáticos y de ácidos grasos de cadena larga en el citosol de las células musculares que llevan a alteraciones en la señal de insulina (IRS1, IRS2, PI3K, etc).

La administración de AHB condujo a una reducción significativa del peso de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal, acompañado de



una disminución en el contenido graso de la carcasa. Además, el tamaño y distribución de los adipocitos del tejido adiposo epididimal tiende a normalizarse. Fickova y col (1998) demostraron, en ratas Wistar, que la incorporación ácidos grasos n-3 a una dieta estándar tiene la capacidad de limitar la hipertrofia del tejido adiposo y de disminuir su peso. Al respecto, Raclot y Groscolas (1993) y Hill y col (1993) demostraron que los ácidos grasos n-3 son movilizados selectivamente de los depósitos grasos y oxidados limitando así la hipertrofia del tejido adiposo.

Varios autores observaron una reducción de la masa de tejido adiposo blanco y del tamaño del adipocito en ratas alimentadas con dietas grasas y ricas en aceite de pescado (EPA, DHA) o ácidos grasos 18:3, n-3 en comparación con aquellos animales que recibieron grasas saturadas (lard) o ricas en ácidos grasos n-6 (aceite de girasol) (Okuno y col, 1997). Al estudiar los mecanismos por los cuales los ácidos grasos n-3 causaban una menor acumulación de grasa corporal, numerosos autores demostraron que esto se debía a un incremento en la termogénesis del tejido adiposo marrón (Ohinata y col, 1998) con incremento de la proteína desacoplante UCP1 (Kawada, 1998) y de los niveles de su mRNA (Takahashi y Ide, 2000). Si bien no tenemos datos en el modelo DRS sobre las proteínas UCP1 y UCP2 en tejido adiposo marrón, un incremento de estas proteínas desacoplantes podría jugar un rol importante en la reducción de la masa del tejido adiposo, del contenido graso de la carcasa y del peso corporal observados.

Otro posible mecanismo responsable de la marcada reducción de la masa del tejido adiposo, de la hipertrofia de las células grasas, y del mejoramiento de la alterada distribución del tamaño celular en el grupo DRS + AHB, podría deberse a la activación de la expresión de los PPAR $\gamma$  realizada por los ácidos grasos n-3. El PPAR $\gamma$ 2 (isoforma del PPAR $\gamma$ ) controla la expresión de genes relacionados con la adipogénesis, transporte, depósito y oxidación de ácidos grasos en el tejido adiposo blanco (Rousseau y col, 1997).



La normalización de los lípidos circulantes (ácidos grasos y triglicéridos) y de la adiposidad visceral luego de la administración de AHB contribuiría a la reversión de la resistencia insulínica periférica global observada en los animales alimentados crónicamente con DRS.

Nuestros resultados permiten poner en evidencia que en el modelo de resistencia insulínica inducido por una ingesta crónica (270 días) de DRS, la sustitución de la fuente de grasa de la dieta (aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao) durante los últimos 60 días de experiencia, lleva a una disminución del peso corporal y del peso de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal, aunque sin alcanzar valores comparables a los del grupo control. Los parámetros plasmáticos (glucosa, triglicéridos y ácidos grasos) se normalizan sin cambios en la concentración plasmática de insulina, con restauración de la sensibilidad insulínica periférica global.



## Parte II

La asociación entre adiposidad visceral e insulino resistencia está ampliamente documentada (Dea y col, 2000) (Bergman y col, 2001) (Kabir y col, 2005).

En el Capítulo I hemos demostrado que la alimentación de ratas normales con una DRS por un período prolongado de tiempo (270 días) induce insulino resistencia, aumento significativo de la grasa visceral (epididimal y retroperitoneal), hipertrofia celular y una alterada distribución de los diámetros de los adipocitos.

El contenido de triglicéridos en la célula adiposa depende del equilibrio entre los procesos metabólicos de reesterificación y síntesis “de novo” de ácidos grasos y de la liberación de los mismos desde los depósitos hacia el plasma a través del mecanismo de lipólisis. Estos procesos dependen de las condiciones fisiológicas y necesidades energéticas del organismo.

A fin de interpretar algunos mecanismos que conducen al observado incremento en el acumulo de triglicéridos y en la consecuente hipertrofia de los adipocitos de ratas alimentadas crónicamente con DRS, se procedió a determinar las actividades de algunas enzimas relacionadas con la captación de ácidos grasos y síntesis “de novo” de los mismos. Así también se evaluó la lipólisis de los triglicéridos celulares en condiciones basales y frente al agonista  $\beta$  adrenérgico isoproterenol, como una estimación de la actividad Lipasa hormona sensible (HSL).



Dada la baja actividad de la enzima gliceroquinasa en el tejido adiposo, el glicerol resultante del proceso de lipólisis es escasamente utilizado en la reesterificación de los acil CoA intracelulares, por lo que el adipocito depende de la disponibilidad y metabolización de la glucosa para la provisión de glicerol-3-P. Siendo el tejido adiposo un tejido muy sensible a la insulina, la captación de glucosa por el adipocito de ratas alimentadas crónicamente con DRS, podría estar muy alterada como consecuencia de la resistencia insulínica periférica global presente en este lote experimental. Para evaluar este aspecto, medimos la captación de glucosa en adipocitos aislados en condiciones basales y frente al estímulo de la insulina. Por otra parte, y como otro parámetro de sensibilidad a la insulina por la célula adiposa, evaluamos la capacidad de la hormona de ejercer su acción antilipolítica en adipocitos aislados de los diferentes grupos experimentales.

Otro de nuestros objetivos fue estudiar los posibles efectos, sobre los parámetros anteriormente mencionados, de la incorporación de ácidos grasos n-3 en la dieta DRS a través de la administración de aceite de hígado de bacalao (AHB).

Para lograr estos objetivos utilizamos tres grupos experimentales: Grupo Control (DC), Grupo Dieta rica en sacarosa (DRS) y Grupo DRS adicionado de AHB (DRS + AHB) en las mismas condiciones y por el mismo período de tiempo, como previamente se detalló en “Materiales y Métodos”.

Una vez finalizado el período experimental de 270 días, los animales fueron sacrificados. Trozos de tejido adiposo epididimal fueron congelados a la temperatura del nitrógeno líquido y el resto del tejido se utilizó para aislar adipocitos según la técnica de Rodbell (1964), realizándose a continuación los estudios de las vías y mecanismos previamente mencionados.

Más detalles de los grupos de animales, componentes de las dietas y metodología utilizada fueron descriptos en el capítulo “Materiales y Métodos”.



Los resultados alcanzados son:

**a- Actividad glucosa-6-P dehidrogenasa (G6PDH) y enzima málica (ME):**

Uno de los destinos metabólicos de la glucosa en la célula adiposa es la vía de las pentosas, que en este tejido constituye la ruta principal de oxidación de la hexosa. En esta vía, la actividad de la G6PDH cumple un rol clave regulando el flujo de carbonos y la producción de NADPH (junto con la enzima málica) necesarios para las síntesis reductoras, como por ejemplo, la síntesis de ácidos grasos.

En el grupo DRS la actividad de las enzimas G6PDH y ME aumentaron significativamente, expresadas tanto por órgano total como por  $10^6$  células, respecto al grupo control (**Figura 6a y 6b**). Una actividad incrementada de estas enzimas estaría indicando una provisión de NADPH que serían necesarios para la síntesis “de novo” de ácidos grasos así como también para su reesterificación.

Cuando se modificó la fuente de grasa de la dieta en el grupo DRS + AHB, la ME, expresada como mU/ $10^6$ cél, alcanzó los mismos valores obtenidos para el lote control, pero cuando se la expresa por órgano total es aún significativamente mayor que el grupo DC. La actividad de la G6PDH descendió dramáticamente alcanzando valores inclusive más bajos que los del grupo DC (**Figura 6a y 6b**).

**b- Actividad acetil-CoA carboxilasa (ACC) y sintetasa de ácidos grasos (FAS):**

Se evaluaron las actividades de enzimas claves en la regulación de la síntesis “de novo” de ácidos grasos, ACC y FAS, en tejido adiposo epididimal.

Cuando las actividades enzimáticas son expresadas por órgano total o por  $10^6$  células (**Figura 7a y 7b**), se observa para FAS un aumento





significativo en el lote DRS respecto al grupo control. La actividad para ACC presenta una tendencia a incrementar, aunque esta diferencia no alcanza a ser significativa. La modificación parcial de la fuente de grasa dietaria (aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB), conduce a una disminución de la actividad enzimática ACC que alcanza niveles semejantes a los del lote DC. La actividad FAS también disminuye significativamente pero cuando se la expresa como U/órgano total aún es significativamente mayor que en el lote control.

### **c- Actividad lipoproteína lipasa (LPL):**

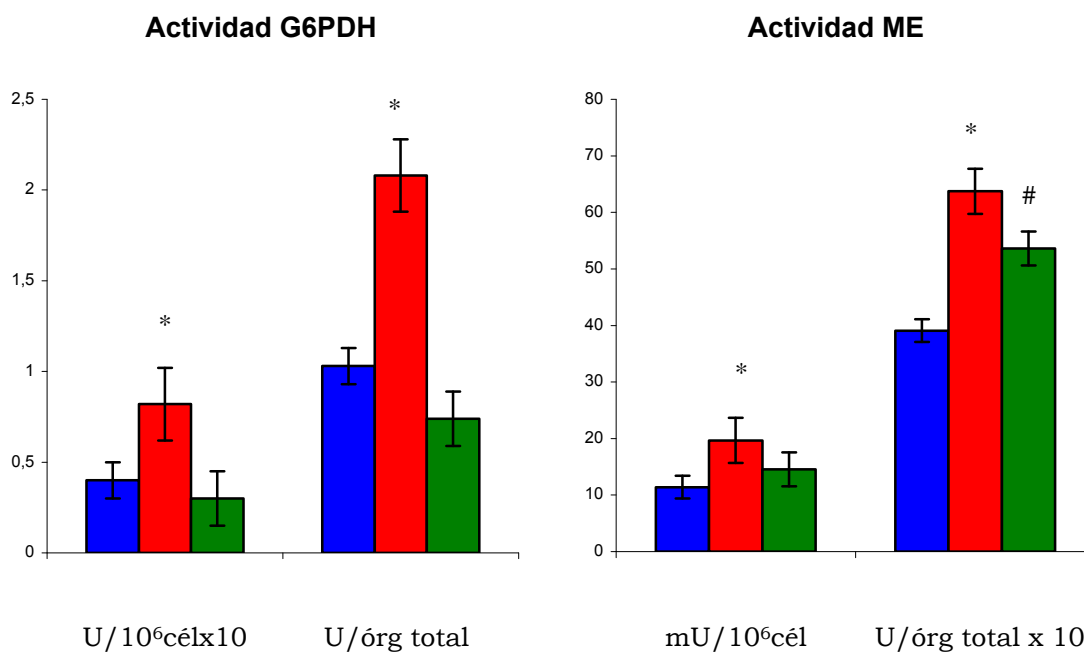
El ingreso de los ácidos grasos provenientes de las lipoproteínas VLDL y quilomicrones a la célula adiposa para ser utilizados por la misma, es mediado por la acción de la enzima LPL, cuya actividad está regulada por factores hormonales y nutricionales (ayuno, alimentación, composición de la dieta, etc).

Las ratas alimentadas con DRS mostraron un aumento significativo en la actividad de la enzima LPL del tejido adiposo epididimal, expresada por peso total del órgano o por el número total de células (**Figura 8a y 8b**).

La administración de AHB disminuye significativamente la actividad de la LPL, cualquiera sea la forma de expresión utilizada, alcanzando valores comparables a los observados en el grupo control (DC) (**Figura 8a y 8b**).



**Figura 6:** Actividad glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH) y enzima málica (ME) en tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.<sup>1</sup>



**Figura 6a**

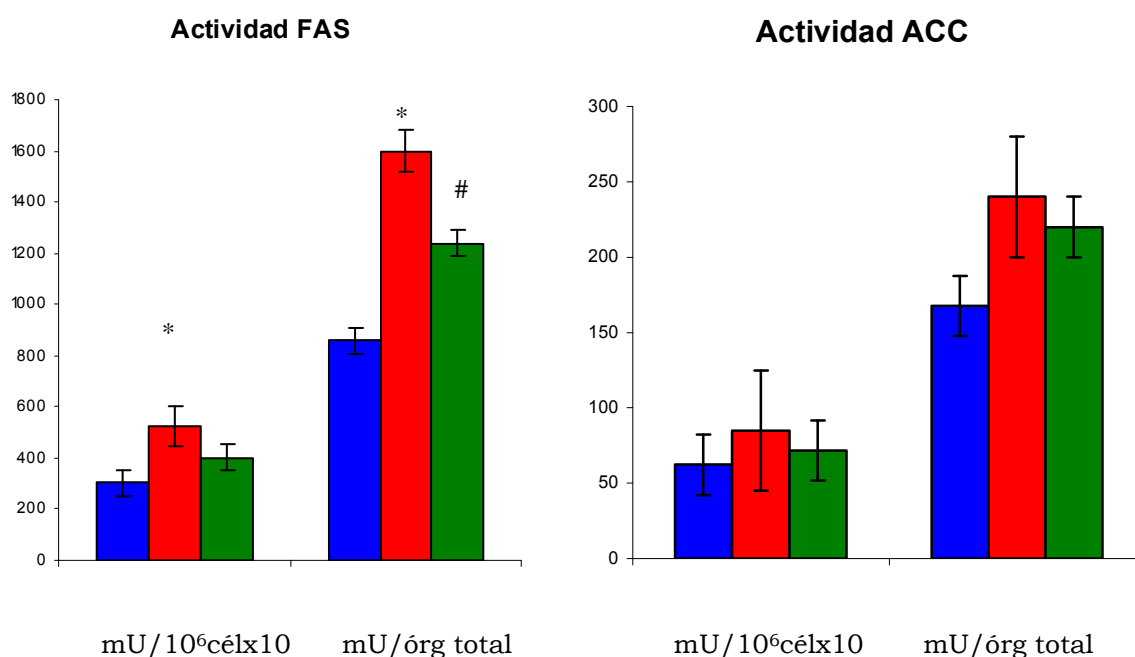
**Figura 6b**

■ DC ■ DRS ■ DRS + AHB

<sup>1</sup> Los valores se expresan como media ± SEM, al menos 6 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. \* p<0,05 DRS vs. DC y DRS + AHB, # p<0,05 DRS + AHB vs. DC.



**Figura 7:** Actividad acetil-CoA carboxilasa (ACC) y sintetasa de ácidos grasos (FAS) en tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.<sup>1</sup>



**Figura 7a**

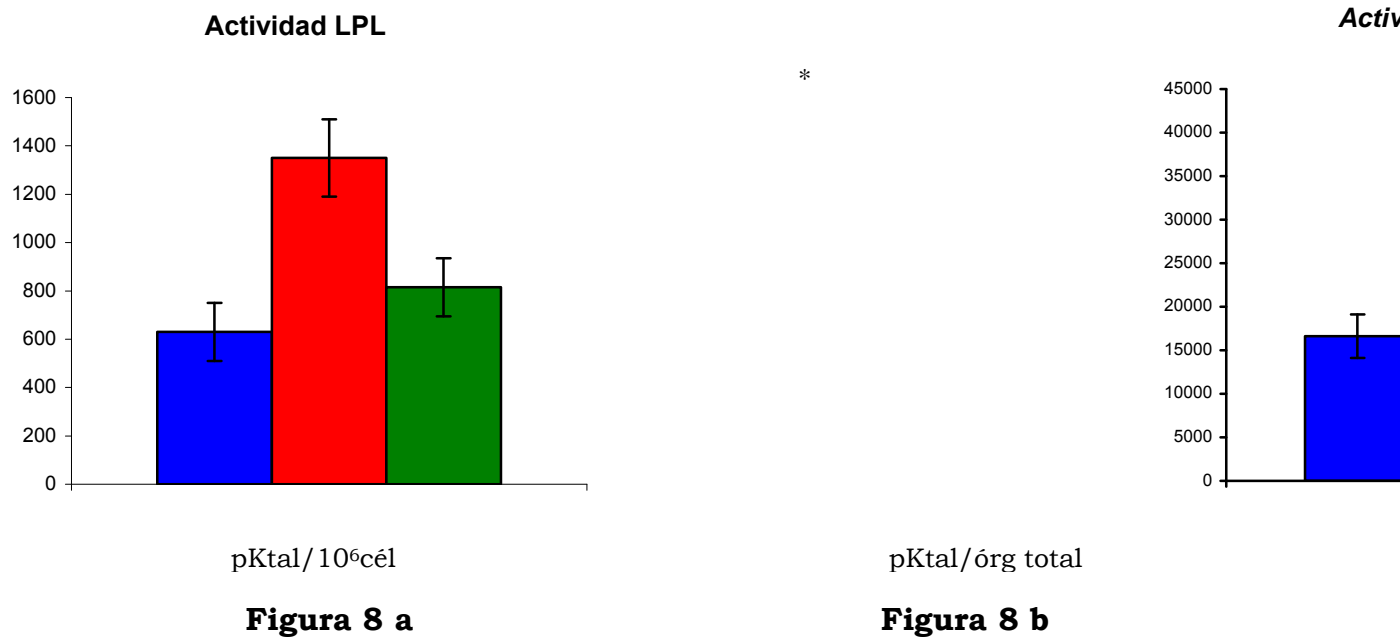
**Figura 7b**

■ DC ■ DRS ■ DRS + AHB

<sup>1</sup> Los valores se expresan como media ± SEM, al menos animales fueron utilizados en cada grupo experimental. \* p<0,05 DRS vs DC y DRS + AHB. # p<0,05 DRS + AHB vs. DC.



**Figura 8:** Actividad enzimática lipoproteína lipasa (LPL) en tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Los valores se expresan como media ± SEM, al menos 6 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. \* p<0.05 DRS vs DC y DRS + AHB.



#### **d- Lipólisis basal y estimulada por isoproterenol en adipocitos aislados**

El tejido adiposo participa en la homeostasis energética del organismo a través del equilibrio entre sus funciones de síntesis “de novo” de ácidos grasos y reesterificación a triglicéridos, y también, a través del proceso de lipólisis en el cual se produce la hidrólisis de los triglicéridos acumulados en la célula adiposa con liberación de ácidos grasos a la circulación general. En este último proceso se encuentra involucrada la enzima lipasa hormona sensible (HSL). Por ello, en la siguiente experiencia, realizada en adipocitos aislados, cuantificamos la lipólisis basal y frente al estímulo del isoproterenol (agonista  $\beta$  adrenérgico) a través del glicerol liberado al medio de incubación, como una estimación de la actividad HSL.

La **Figura 9** muestra el glicerol liberado al medio de incubación - como índice de lipólisis - por los adipocitos aislados de los diferentes grupos experimentales.

La lipólisis basal “in vitro” está aumentada, aproximadamente 4 veces, en las células adiposas de las ratas pertenecientes al grupo DRS respecto al grupo DC. Estos resultados señalan que en el lote DRS, un incremento de la lipólisis basal podría ser uno de los mecanismos responsables de los niveles plasmáticos elevados de ácidos grasos presentes en dicho lote.

Cuando la fuente de grasa es parcialmente reemplazada por AHB, la lipólisis basal disminuye significativamente respecto al grupo DRS aunque los valores se mantienen levemente superiores respecto al grupo DC.



En la **Figura 9** también se observa la respuesta lipolítica al agonista  $\beta$  adrenérgico isoproterenol ( $10^{-6}$  M) en adipocitos aislados de los distintos grupos dietarios.

En términos de valores absolutos, la lipólisis estimulada por isoproterenol fue significativamente mayor que la lipólisis basal ( $p < 0,05$ ) en todos los grupos experimentales. Sin embargo, la estimulación relativa, veces de incremento respecto al basal, fue menor en el grupo DRS (2,5 veces) que en los otros grupos dietarios (6,5 y 4,0 veces en DC y DRS + AHB, respectivamente).

#### **e- Acción antilipolítica de la insulina**

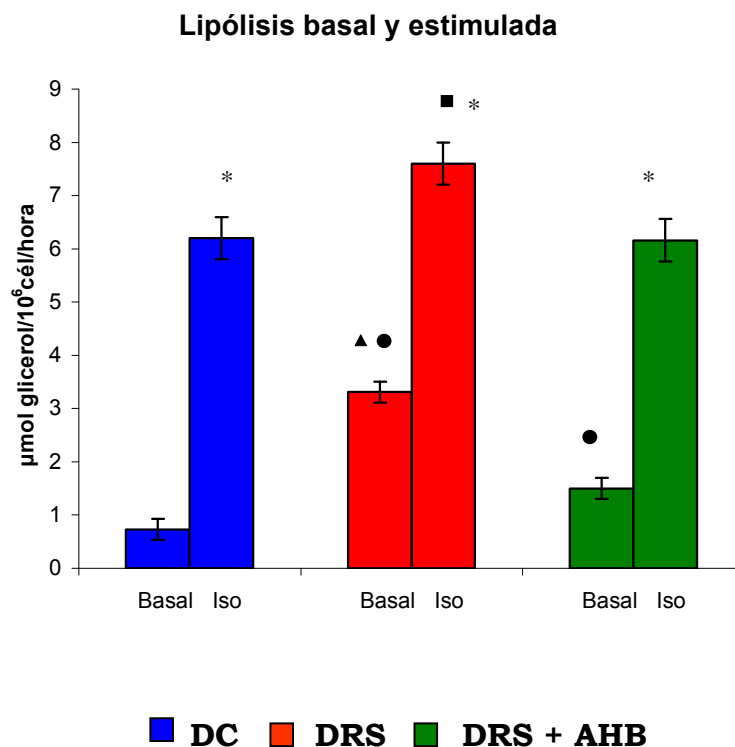
La rápida reversión de la lipólisis inducida por la insulina se refleja en una reducción de la cantidad de glicerol liberado al medio por los adipocitos incubados en presencia del  $\beta$  agonista isoproterenol cuando se los compara con muestras que son incubadas en paralelo en ausencia de la hormona.

La **Figura 10** muestra la supresión de la lipólisis estimulada por isoproterenol mediada por la insulina. Comparada con el grupo DC, los adipocitos de los animales alimentados con DRS mostraron una disminución de la sensibilidad a los efectos antilipolíticos de la insulina.

Por otra parte, la sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria, aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao, en el grupo DRS + AHB reestablece completamente la sensibilidad del adipocito a la acción antilipolítica de la insulina.



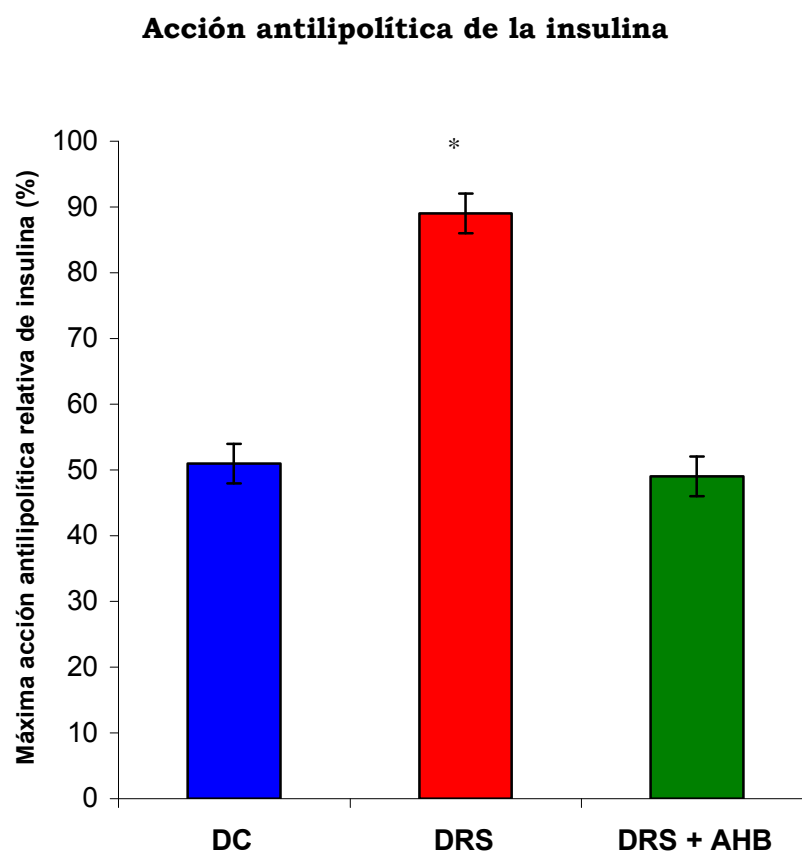
**Figura 9:** Lipólisis basal y estimulada por isoproterenol (Iso) en adipocitos aislados de tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM, al menos 8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. ▲  $p < 0,05$  DRS basal vs. DC o DRS + AHB basal. ●  $p < 0,05$  DRS basal o DRS + AHB vs. DC basal. \*  $p < 0,05$  isoproterenol ( $10^{-6}$  M) vs. su respectivo grupo basal. ■  $p < 0,05$  DRS isoproterenol ( $10^{-6}$  M) vs. DC isoproterenol ( $10^{-6}$  M) o DRS + AHB isoproterenol ( $10^{-6}$  M).



**Figura 10:** Máxima acción antilipolítica relativa de la insulina en adipocitos aislados de tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM, al menos 8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. Los adipocitos fueron incubados por triplicado con isoproterenol  $10^{-7}$  M en presencia o ausencia de insulina 1,7 nM. Los resultados se expresan como el porcentaje entre el valor de lipólisis inhibida por la insulina y el valor correspondiente a la lipólisis estimulada por isoproterenol en ausencia de insulina. \*  $p < 0,05$  DRS vs. DC y DRS + AHB.





#### **d- Captación de glucosa por el adipocito**

En el tejido adiposo los ácidos grasos provenientes de la hidrólisis de los triglicéridos de las VLDL y/o quilomicrones o los unidos a la albúmina, tienen como destino principal su reesterificación para formar los triglicéridos de depósito. Debido a la baja actividad de la enzima glicerocinasa en este tejido, el glicerol-3-fosfato necesario para este proceso metabólico depende de la captación y posterior metabolización de la glucosa.

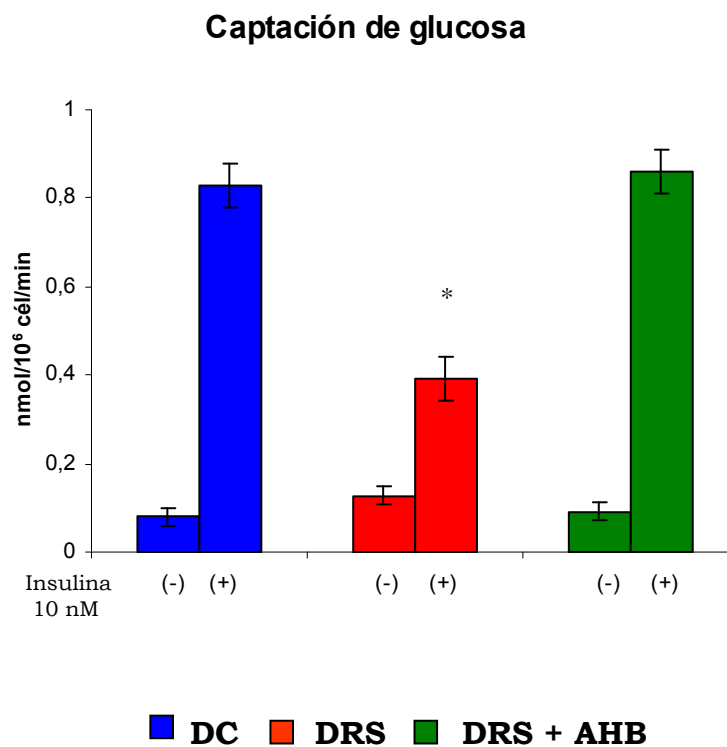
La entrada de glucosa al adipocito se realiza fundamentalmente por difusión facilitada, mediante un mecanismo saturable y estereoespecífico estimulada por la insulina, en el que intervienen proteínas transportadoras de la familia de los GLUT (GLUT 4).

Con el objeto de analizar este aspecto del problema, estudiamos la captación de glucosa en adipocitos aislados en condiciones basales y frente al estímulo de insulina en los tres grupos experimentales.

En la **Figura 11** se observa la captación de glucosa por parte de los adipocitos en condiciones basales y estimuladas por insulina. En condiciones basales, la captación de glucosa fue similar en los tres grupos dietarios, mientras que bajo el estímulo de la insulina la captación de glucosa disminuyó significativamente en el grupo alimentado con DRS. La administración de AHB normalizó la captación de glucosa en este grupo de animales.



**Figura 11:** Captación de glucosa en adipocitos aislados de tejido epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM, al menos 8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental.\*  $p < 0,05$  DRS vs. DC y DRS + AHB.



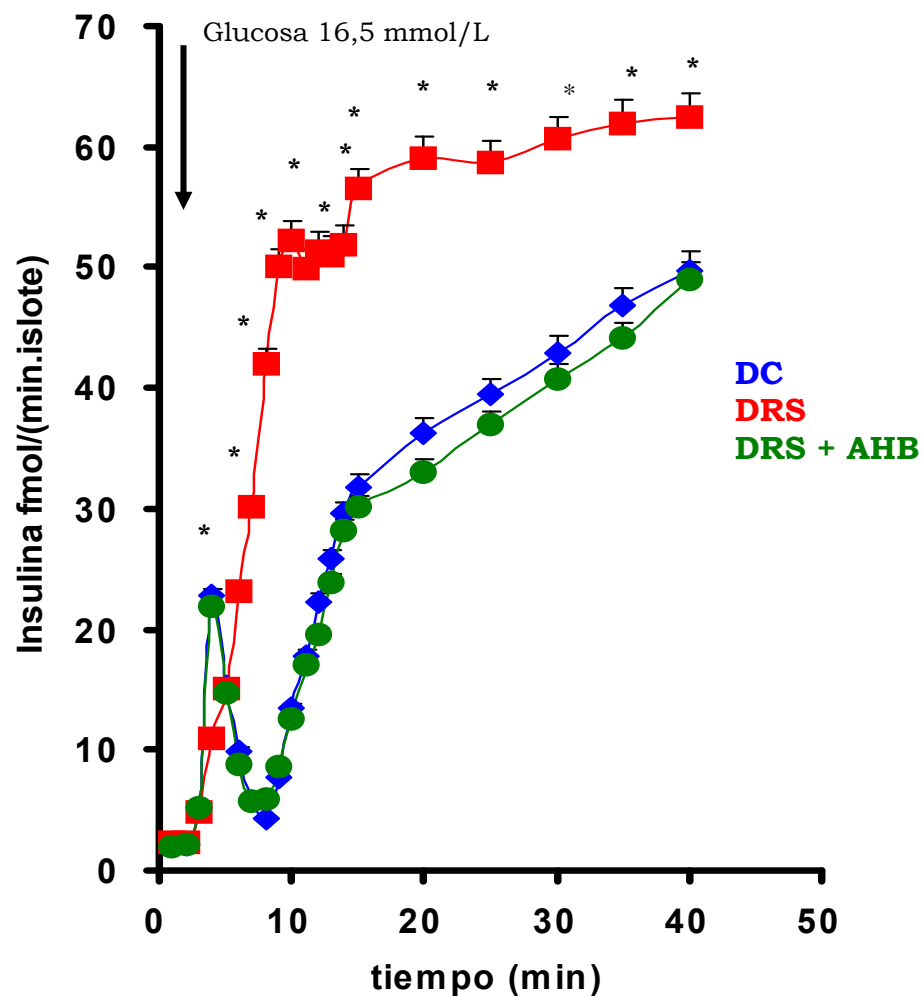
### **e- Secreción de insulina por islotes pancreáticos**

En la **Figura 12** se observa el patrón de secreción de insulina de los islotes pancreáticos perfundidos aislados de animales de los tres grupos dietarios.

La secreción de insulina bajo el estímulo de la glucosa (16,5 mmol/l) en ratas alimentadas con DC mostró el clásico patrón bifásico, con un primer pico de secreción de la hormona a los 4 minutos y una segunda fase que alcanzó su valor máximo a los 40 minutos de comenzada la perfusión. En el grupo DRS se observa ausencia del primer pico de secreción y una segunda fase hipersecretora cuando se lo compara con los animales controles. La alterada secreción de insulina en los animales alimentados con DRS se normaliza completamente cuando se sustituye la fuente de grasa de la dieta en el grupo DRS (aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao) durante los últimos 60 días del período experimental (Pighín y col, 2003).



**Figura 12:** Secreción de insulina bajo el estímulo de glucosa en islotes pancreáticos perifundidos de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) al final del período experimental.<sup>1</sup>





<sup>1</sup> Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM, al menos 6 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. \*  $p < 0,05$  DRS vs. DC y DRS + AHB en cada tiempo.

Cuando la dieta rica en sacarosa es administrada a ratas normales machos Wistar por un período prolongado de tiempo (270 días) se producen importantes cambios metabólicos y morfológicos en el animal “in toto”. Se evidencia una franca resistencia insulínica periférica global que engloba a uno de los tejidos target a la acción de la hormona como lo es el tejido adiposo. Así lo indican la disminuida acción antilipolítica de la insulina y la disminuida captación de glucosa estimulada por la hormona en el adipocito aislado de estos animales. Además, el patrón bifásico de secreción de insulina (estimulado por glucosa) por el páncreas, se halla evidentemente deteriorado, con pérdida del primer pico y presencia de una segunda fase hipersecretora. Todas estas alteraciones se acompañan de dislipidemia e incremento de la adiposidad visceral.

Interesantemente, la adición de aceite de hígado de bacalao (rico en ácidos grasos n-3) durante los últimos 60 días de experiencia, logra revertir la resistencia insulínica tanto a nivel periférico global como a nivel del tejido adiposo epididimal. Estos efectos se acompañan de la normalización del patrón de secreción de insulina estimulado por glucosa, junto a una disminución de la adiposidad visceral.

El tejido adiposo es hoy considerado como un importante órgano secretor que libera a la circulación moléculas llamadas adipocitoquinas. Estas moléculas (Ej.: leptina, adiponectina) son capaces de comunicarse con otros tejidos y órganos e inclusive con las demás células adiposas y de esta manera regular el metabolismo glucídico y lipídico, y además, accionar sobre el balance energético y la acción insulínica.

Al respecto, otro de nuestros objetivos fue evaluar a) si la regulación de las adipocitoquinas, especialmente leptina y adiponectina, contribuyen a



la resistencia insulínica periférica global y adiposidad inducida por la ingesta prolongada (270 días) de una dieta rica en sacarosa, y b) si estos cambios pueden ser revertidos o mejorados por la administración de aceite de hígado de bacalao durante los últimos 60 días de la experiencia.

Para lograr estos objetivos se utilizaron tres grupos experimentales: Grupo Control (DC), Grupo Dieta Rica en Sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB). Más detalles de los grupos de animales y componentes de las dietas fueron descritos en el capítulo “Materiales y Métodos”.

Finalizado el período experimental, los animales se sacrificaron y se tomaron muestras de plasma y tejido adiposo analizándose los niveles plasmáticos y la expresión del mRNA para la leptina y adiponectina, en tejido adiposo epididimal y retroperitoneal como se describió previamente en el capítulo “Materiales y Métodos”.

Los resultados alcanzados son:

#### **f- Niveles de leptina y adiponectina en plasma**

En la **tabla 8** podemos observar los niveles de leptina y adiponectina plasmáticos. Estos disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) en el grupo DRS respecto al grupo DC, mientras que en el grupo DRS + AHB los valores aumentaron hasta ser comparables con los del grupo de referencia DC.

#### **g- Expresión del mRNA para el gen ob (leptina) y el gen adiponectina en tejido adiposo epididimal y retroperitoneal**

Tanto el mRNA para el gen ob como para el gen adiponectina, mostraron un perfil similar en tejido adiposo epididimal y retroperitoneal dentro del mismo grupo experimental. Por ello, la **Figura 13** muestra el mRNA para cada uno de los genes estudiados, en tejido adiposo blanco



(epididimal + retroperitoneal) al final del período de ingesta (270 días) en los distintos lotes de animales.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales.

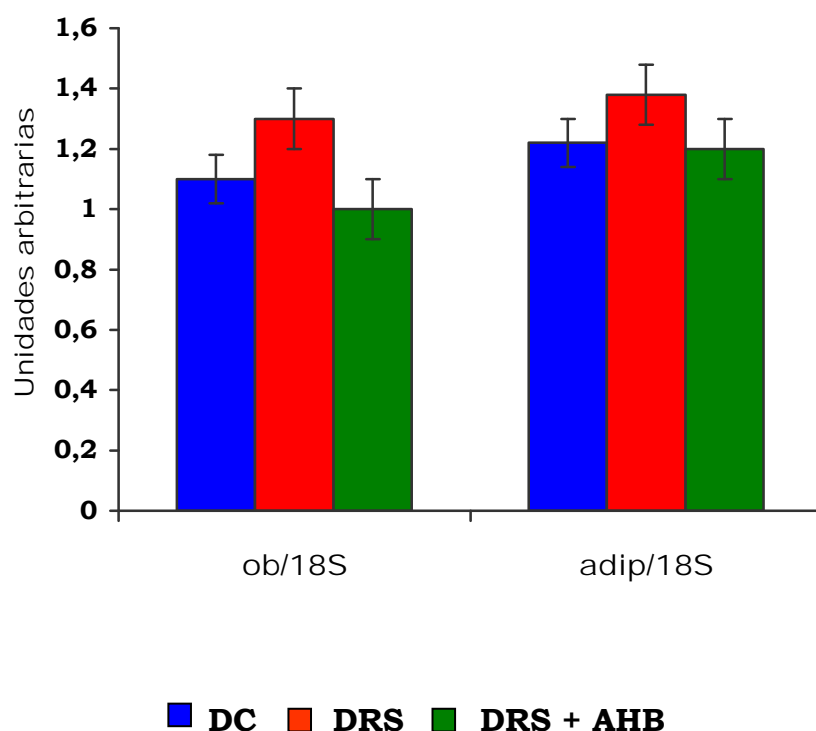
**Tabla 8:** Niveles de leptina y adiponectina plasmáticos de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.<sup>1</sup>

	<b>DC</b>	<b>DRS</b>	<b>DRS + AHB</b>
<b>Leptina</b> (ng/ml)	18,70 ± 3,39 <sup>a</sup>	9,04 ± 1,01 <sup>b</sup>	17,56 ± 3,13 <sup>a</sup>
<b>Adiponectina</b> (µg/ml)	2,58 ± 0,48 <sup>a</sup>	1,74 ± 0,15 <sup>b</sup>	3,20 ± 0,20 <sup>a</sup>

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



**Figura 13:** Cuantificación de la expresión del mRNA para leptina (ob) y adiponectina (adip) en tejido adiposo blanco (epididimal + retroperitoneal) de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB) al final del período experimental.<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Los niveles de mRNA fueron determinados por “real time” RT-PCR cuantitativa. Los valores representan la media  $\pm$  SEM y se expresan como unidades arbitrarias (ob/18S; adiponectina/18S). Cinco determinaciones individuales fueron incluidas en cada grupo experimental.





## **Discusión Parte II**

Los mecanismos de hidrólisis y síntesis de triglicéridos en el tejido adiposo determinan que la masa de los lípidos presentes en el mismo sea el resultado del balance neto entre las velocidades relativas de lipólisis de triglicéridos y reesterificación de ácidos grasos. Por otra parte, la actividad metabólica de los adipocitos se encuentra influenciada por el tamaño de los mismos en ratas (Bjorntorp y Sjostrom, 1972) (Smith y col, 1974) y en humanos (Smith, 1971).

En el modelo de DRS observamos una hipertrofia de la célula adiposa que se corresponde con un incremento del contenido de triglicéridos en dicha célula. Una de las vías metabólicas que contribuye a este acumulo de triglicéridos es la de síntesis “de novo” de ácidos grasos, catalizada por las enzimas lipogénicas. En este contexto, las ratas alimentadas crónicamente con DRS presentan un incremento de algunas de las enzimas claves relacionadas con la síntesis “de novo” de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal (sintetasa de ácidos grasos (FAS) y, en menor medida, acetil CoA carboxilasa (ACC).

La enzima ACC cataliza la conversión de acetil-CoA a malonil-CoA para la síntesis de ácidos grasos en los tejidos lipogénicos, como en el caso del tejido adiposo y el hígado. El malonil-CoA es un regulador clave de la oxidación de los ácidos grasos y del metabolismo energético, inhibiendo la enzima carnitina palmitoil transferasa I (CPT1) y por lo tanto, la oxidación



mitocondrial de ácidos grasos. Al respecto, Oh y col (2005) demostraron en ratones knock out para ACC 2 (ACC2 -/-) (una de las isoformas de ACC) alimentados con una dieta rica en grasa e hidratos de carbono (59% de las calorías aportadas por la grasa y 24% aportadas por los hidratos de carbono), que estos animales estaban protegidos contra el desarrollo de obesidad y resistencia insulínica. Adipocitos aislados de estos animales muestran un aumento de la oxidación de ácidos grasos y una disminución de los depósitos grasos.

Estudios realizados por Shafrir (1985) en ratones albinos y spiny (*Acomys Cahirinus*) alimentados durante un mediano plazo (3 meses) con una dieta rica en fructosa (50% p/p), demostraron un incremento significativo de las enzimas ACC y FAS. Blakely y col (1982), alimentando ratas Wistar con una dieta con 15-20 % p/p de fructosa por 9 meses, observaron un incremento de las enzimas lipogénicas en el tejido adiposo epididimal de estos animales. Si bien existen diferencias entre las experiencias realizadas por estos autores y la nuestra (especie de roedor, tiempo de administración de la dieta y/o tipo de hidrato de carbono utilizado), sus hallazgos con respecto a la actividad de las enzimas lipogénicas frente a la presencia de fructosa en la dieta, se corresponden con los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis.

De acuerdo con ello, Minehira y col (2003) demostraron, en humanos sanos, que la sobrealimentación con hidratos de carbono incrementó significativamente en tejido adiposo subcutáneo el mRNA que codifica para las enzimas claves de la síntesis “de novo” tales como FAS y ACC.

Una ruta muy importante de la oxidación de la glucosa en el tejido adiposo es la vía de las pentosas, la cual produce cofactores reducidos necesarios para las síntesis de ácidos grasos. La enzima glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH), una enzima clave en esta vía, se encuentra regulada por la insulina. Existen también otras enzimas implicadas en la



generación de cofactores reducidos como la enzima málica (ME) y la 6-fosfogluconato dehidrogenasa (6PGDH). Una actividad normal o incrementada de estas enzimas indicaría una provisión adecuada de NADPH necesarios para la síntesis de ácidos grasos. Nuestros resultados indican que en el grupo DRS se observa un incremento significativo en la actividad de la G6PDH y de la ME en tejido adiposo epididimal.

Al respecto, el nivel del mRNA y la actividad enzimática para G6PDH se encuentran elevados en el tejido adiposo de varios modelos de obesidad en ratones (db/db, ob/ob, obesidad inducida por dieta), implicando que un incremento de la expresión de G6PDH está asociado con una actividad lipogénica anormal en el tejido en estudio (Park y col, 2005).

En relación a esto, Cohen y col (1972) señalaron un aumento significativo en la actividad de las enzimas de la vía de las pentosas, G6PDH y 6P-gluconato dehidrogenasa, además de un incremento de la actividad de la enzima NADP-malato deshidrogenada en el tejido adiposo de ratas albinas alimentadas durante 12 meses con una DRS (72% p/p).

Otro de los procesos que contribuyen al acúmulo de triglicéridos en tejido adiposo es la captación de ácidos grasos provenientes de las lipoproteínas plasmáticas ricas en triglicéridos (VLDL y Quilomicrones) mediada por la acción de la enzima lipoproteína lipasa (LPL).

La mayor actividad enzimática de la LPL epididimal y el incremento del contenido lipídico celular en presencia de hipertrigliceridemia en el grupo DRS, sugiere una acción de masas: la gran disponibilidad de triglicéridos asociados a las lipoproteínas circulantes conduciría a una mayor captación de ácidos grasos por el tejido adiposo, determinando una mayor disponibilidad de los mismos para reesterificarse y pasar a formar parte del depósito de triglicéridos en la célula adiposa.

Para este proceso, los ácidos grasos deben ser transportados por proteínas a través del citoplasma celular. La abundancia de estas proteínas



transportadoras está regulada por las demandas metabólicas de la célula en cuestión, siendo su expresión y regulación similar en ratones y humanos (Tuncman y col, 2006). Numerosos estudios han demostrado que el transporte de ácidos grasos y/o la expresión de sus proteínas transportadoras pueden estar alterados en modelos animales con insulino resistencia. Memon y col (1999) demostraron en tejido adiposo de ratones ob/ob, un aumento en la expresión del mRNA para FAT/CD36 y FABP. Por otro lado, la captación de ácidos grasos se encuentra incrementada en adipocitos de roedores con insulino resistencia y obesidad genética (Luiken y col, 2002) (Berk y col, 1997) y/o inducida por la dieta (Berk y col, 1999). Además, ratones con déficit de FABP en tejido adiposo, alimentados con una dieta grasa, no desarrollaron insulino resistencia (Xu y col, 2006).

Vrāna y Fabry (1973) observaron una mayor incorporación del glicerol - proveniente del metabolismo de la glucosa - a triglicéridos en el tejido adiposo de ratas alimentadas durante cuatro semanas con fructosa. Además, una actividad LPL normal por unidad de peso en el tejido adiposo epididimal, que se traduce en un incremento significativo cuando se refiere al órgano total, fue observada por Deshaies (1986) en ratas Wistar alimentadas con DRS (63% p/p) por el mismo período de tiempo. Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestra experiencia.

La insulina es el mayor promotor de la actividad de la LPL, aumentando su síntesis, dimerización, secreción y su masa asociada a la superficie celular (Faraj y col, 2004) (Knutson, 2000). Sin embargo, en el presente trabajo los niveles de insulinemia consecuentes a la administración a largo plazo de una DRS (normoinsulinemia) no serían responsables de la estimulación de la actividad LPL en el tejido adiposo epididimal de estos animales (aumentada respecto del grupo DC).

El tejido adiposo es un tejido clave tanto en el almacenamiento de lípidos como en la provisión de ácidos grasos al plasma para su utilización por el resto de los tejidos. Un incremento y disponibilidad de ácidos grasos



plasmáticos consecuentes a un aumento en la actividad HSL del tejido adiposo, podría alterar la sensibilidad insulínica y la captación y utilización de la glucosa por los tejidos. La lipólisis de los triglicéridos del tejido adiposo (indicada como glicerol liberado) se relaciona con un incremento del contenido intracelular de triglicéridos y del tamaño celular. Al respecto, varios autores (Tsujita y col, 1995) (Morimoto y col, 1998) demostraron una incrementada lipólisis basal en las células adiposas hipertrofiadas de ratas obesas. Los adipocitos de mayor tamaño presentan una mayor actividad de la lipasa sensible a hormonas (HSL) (Tsujita y col, 1995). Aún más, recientemente se ha demostrado que la actividad lipolítica de las células adiposas refleja no solo la actividad de la enzima HSL sino también la translocación de la enzima a la gota grasa intracelular en respuesta a agentes lipolíticos (Morimoto y col, 2001). También es interesante destacar lo observado por Herberg y col (1970) en ratones genéticamente obesos (New Zealand) donde un incremento lineal de la lipólisis basal espontánea y estimulada se correlaciona con un incremento en el tamaño celular.

En nuestro diseño experimental la hipertrofia de los adipocitos se correlaciona con una mayor lipólisis basal de ácidos grasos sugiriendo un mayor clivaje de los depósitos de triglicéridos celulares en el tejido adiposo. Por otro lado, la estimulación de la lipólisis por el agonista  $\beta$  adrenérgico isoproterenol respecto al valor basal en los adipocitos aislados de animales DRS, fue menor al observado en el grupo control. De esta manera, una menor respuesta lipolítica neta al efector se asociaría principalmente a la mayor lipólisis basal que presentan las células hipertróficas del grupo DRS. Este mecanismo contribuiría al incremento de ácidos grasos plasmáticos observado en el grupo DRS.

Algunas de las alteraciones metabólicas que llevan a la hipertrofia de las células grasas estarían asociadas con la expresión del PPAR  $\gamma$  (Nadler y col, 2000) (Farmer, 2005). Este, se expresa principalmente en tejido adiposo y se encuentra involucrado en funciones críticas como la



adipogénesis y el metabolismo de la glucosa y colesterol. Induce la diferenciación adipocitaria desde preadipocitos hacia adipocitos maduros y funcionales y estimula la captación de ácidos grasos y su esterificación a triglicéridos en coordinación con el SREBP-1 que regula la lipogénesis para llenar la gota grasa (Farmer, 2005).

Luego de la diferenciación terminal, el gen PPAR y se expresa para mantener el fenotipo de adipocito maduro, aunque, en tejido adiposo de ratones y humanos obesos, el mRNA para el gen PPAR y se encuentra significativamente disminuido (Brun y Spiegelman, 1997). Como consecuencia, el adipocito, aunque repleto de lípidos (hipertrofiado), tiene sobrepasada su capacidad para esterificar el gran exceso de ácidos grasos a triglicéridos, conduciendo a un aumento en la liberación de los mismos hacia el torrente sanguíneo y de allí a otros tejidos no adiposos (Unger y Zhou, 2001) (Torres y col, 2006). Un incremento y disponibilidad de ácidos grasos plasmáticos podría alterar la sensibilidad insulínica y la captación y utilización de la glucosa por los tejidos.

Una mayor actividad lipolítica basal e incremento de los ácidos grasos plasmáticos fueron observados también por Shafrir y Trostter (1984) en ratones Spiny (*Acomys Cahirinus*) alimentados con DRS durante 3 meses. Sin embargo en estos animales, a diferencia de nuestro modelo experimental, se observa una disminución del tamaño de los depósitos grasos incluyendo el del tejido adiposo epididimal. Esta diferencia respecto a nuestros hallazgos, se debería, como mencionáramos anteriormente, a distintas respuestas a la administración de sacarosa según la especie de roedor utilizada.

La insulina juega un rol fundamental en el metabolismo lipídico del tejido adiposo. En este órgano la hormona inhibe la lipólisis y estimula la conversión de glucosa a lípidos (lipogénesis). La marcada reducción del efecto antilipolítico de la insulina observado en los animales alimentados con DRS, podría ser uno de los mecanismos involucrados en el incremento de la



lipólisis basal de este grupo experimental. Hallazgos semejantes fueron evidenciados por Gries y col (1972) en células grasas abdominales de humanos obesos.

Debido a la baja actividad de la enzima gliceroquinasa en el tejido adiposo, el glicerol resultante de la lipólisis es escasamente utilizado en la esterificación de los acil-CoA intracelulares. Por lo tanto el adipocito depende de la captación y del metabolismo de la glucosa para la provisión del glicerol-3P. Así, la captación de glucosa por el adipocito es uno de los pasos fundamentales para su metabolismo en este tejido. Boden (1996) demostró que los ácidos grasos parecen ejercer un efecto inhibitorio sobre la captación de glucosa solo bajo el estímulo de la insulina. Nuestros resultados concuerdan con ello: mientras que en condiciones basales no existieron diferencias significativas en la captación de glucosa entre los grupos, el efecto estimulador de la insulina fue menor en las ratas dislipidémicas alimentadas con dieta DRS.

Shepherd y Kahn (1999) observaron que la resistencia a los efectos de la insulina sobre el transporte y metabolismo de la glucosa en músculo y adipocitos es uno de los defectos más tempranos en el desarrollo de la resistencia insulínica. Nuestros resultados sugieren una resistencia del tejido adiposo a la acción de la insulina (menor acción antilipolítica de la hormona y menor captación de glucosa bajo el estímulo de la insulina).

Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, demuestran que el entorno metabólico-hormonal de los animales alimentados con una DRS es muy diferente en el corto plazo (3-5 semanas) respecto al largo plazo (30-40 semanas). Durante el primer período, se observa dislipidemia con normoglucemia basal e hiperinsulinemia, mientras que en el período a largo plazo, los animales demuestran una dislipidemia más marcada con hiperglucemia moderada y normoinsulinemia. Ambos períodos se caracterizan por la presencia de resistencia insulínica (Bernal y col, 1995) (Chicco y col, 2003).





La resistencia insulínica debido a la ingesta de sacarosa o fructosa ha sido demostrada previamente a nivel del tejido adiposo, pero en estudios realizados a corto plazo, es decir, con la presencia de hiperinsulinemia. Luo y col (1996) constataron en ratas normales que la alimentación con fructosa (62% p/p) durante 6 semanas, determina en adipocitos aislados una menor incorporación de glucosa a lípidos en respuesta a una dosis de estímulo máximo de insulina, asociada a una ligera disminución de CO<sub>2</sub>, sin que se presenten alteraciones en el transporte de la misma en los adipocitos. Una menor conversión de glucosa a lípidos en condiciones basales junto con una mayor conversión de glucosa a CO<sub>2</sub> fue descrita por Blakely y col (1987) en ratas alimentadas con fructosa (27% p/p) durante 4 semanas. Más aún, Vrāna y col (1993) constataron una menor conversión de glucosa a triglicéridos (basal y estimulada por insulina) sin modificaciones de la incorporación de glucosa a glucógeno en ratas alimentadas con sacarosa (79% p/p) por el mismo período de tiempo (4 semanas).

Nuestros resultados muestran que la captación de glucosa basal en adipocitos aislados es el grupo DRS es similar al grupo control. Sin embargo, bajo el estímulo de la insulina esta captación es menor. De acuerdo con esto, Park y col (2005) observaron en adipocitos que sobreexpresaron G6PDH, un incremento del contenido celular de ácidos grasos y triglicéridos así como también una disminución en la captación de glucosa estimulada por insulina y un aumento de la lipólisis a través del incremento de la expresión de la lipasa hormona sensible (HSL). Por su parte, Aguilera y col (2004) demostraron un aumento de los niveles de TNF- $\alpha$  (estimulante de la lipólisis) en ratas macho Wistar a las que se suministró sacarosa (30%) en el agua de bebida durante 21 días.

Otras adipocitoquinas sintetizadas y secretadas por el tejido adiposo, entre ellas la leptina y adiponectina, modulan varias funciones biológicas y juegan un rol importante en el metabolismo de lípidos y glucosa. Nuestros resultados demuestran que la administración crónica (270 días) de





una DRS a ratas normales Wistar induce una disminución de los niveles plasmáticos de leptina y adiponectina. La presencia de adiposidad, dislipidemia y resistencia insulínica, acompañan estas modificaciones, sin cambios en la expresión génica de ambas adipocitoquinas en tejido adiposo blanco. Varios estudios realizados en roedores y humanos, y de acuerdo con nuestros resultados, han encontrado una actividad metabólica alterada en el adipocito durante el desarrollo de obesidad y desórdenes relacionados, conduciendo a niveles plasmáticos de leptina y adiponectina anormales (Wajchenberg, 2000) (Ding y col, 2005).

El tamaño del tejido adiposo blanco, incrementa con la edad y contribuye a aumentar la adiposidad y los niveles plasmáticos de leptina, tanto en humanos (Pittas y col, 2004) (Meier y Gressner, 2004) como en animales (Ahren y col, 1997). En nuestro estudio, sin embargo, el moderado incremento del peso corporal y de la adiposidad con hipertrofia de las células grasas en los animales alimentados con DRS, no se correlaciona positivamente con los niveles plasmáticos de leptina, que inclusive disminuyen.

La disociación entre cambios en los niveles plasmáticos de leptina, peso corporal y masa del tejido adiposo en el modelo de resistencia insulínica inducido por sacarosa, está presente solo cuando la ingesta de la DRS es crónica. Peyron-Caso y col (2002 b) previamente demostraron que la administración de dieta rica en sacarosa a ratas Sprague-Dawley durante un corto período de tiempo (3-6 semanas) induce un incremento paralelo de la adiposidad y de la leptina plasmática.

El descenso de los niveles de leptina plasmáticos en nuestros resultados puede deberse a una exposición prolongada a niveles aumentados de ácidos grasos plasmáticos. Recientemente se ha demostrado que tanto la masa proteica como los niveles de mRNA para el gen *ob*, disminuían en presencia de triacsina y ácidos grasos de cadena larga mono y polinosaturados en cultivo de adipocitos de ratas (Shintani y col, 2000)



(Cammisotto y col, 2003), sugiriendo que niveles elevados de ácidos grasos en plasma podría llevar a una supresión relativa en la secreción de leptina por el tejido adiposo. Cammisotto y col (2003) mostraron que un incremento en el contenido intracelular de ácidos grasos, generados por una intensa actividad lipolítica, inhibe la secreción de leptina. Consecuentemente, esto sugiere que los ácidos grasos de cadena larga podrían jugar un rol importante entre la activación de la lipólisis y la inhibición final de la secreción de leptina por los adipocitos del tejido adiposo blanco.

Un mecanismo alternativo de disminución de los niveles de leptina plasmáticos en el largo plazo de administración de la dieta rica en sacarosa podría ser la marcada hipertrigliceridemia presente en este modelo experimental. Banks y col (2004) recientemente demostraron que incrementando los niveles plasmáticos de triglicéridos se inhibía el transporte de leptina a través de la barrera hematoencefálica, induciendo por lo tanto resistencia a la leptina. Los triglicéridos actuarían directamente sobre los transportadores de leptina o uniéndose a la hormona en la circulación. En el presente estudio, el dosaje de leptina en plasma podría estar enmascarado por complejos triglicéridos-leptina, resultando por lo tanto en una subestimación de los niveles de leptinemia. Esto podría contribuir al incremento en la ingesta calórica y consecuente incremento del peso del tejido adiposo y del peso corporal.

Los niveles de adiponectina mostraron una regulación paralela a la encontrada para la leptina: la insulino resistencia inducida por la alimentación crónica con una dieta rica en sacarosa a ratas Wistar, disminuye los niveles de adiponectina en el plasma. Esto es consistente con muchos estudios que demostraron una disminución en los niveles plasmáticos de adiponectina en Resistencia Insulínica y obesidad (Hu y col, 1996) (Weyer y col, 2001).

Estudios “in vivo” indican que los niveles en ayuno de insulina están negativamente correlacionados con los niveles plasmáticos de adiponectina



(Yu y col, 2002) (Bluher y col, 2002). Estos resultados concuerdan con resultados “in vitro” que demuestran que el tratamiento crónico con insulina reduce la expresión de adiponectina en adipocitos 3T3-L1 (Fasshauer y col, 2002). La alimentación crónica con DRS en nuestro estudio se acompañó de normoinsulinemia. Por lo tanto, la insulina no siempre se correlaciona con los niveles de adiponectina en plasma. La concentración de adiponectina se correlaciona negativamente con un incremento de la lipólisis y liberación de ácidos grasos por el tejido adiposo (Delporte y col, 2002). En el presente estudio, luego de 270 días de alimentación con DRS, las modificaciones en los niveles de ácidos grasos eran opuestas a las de adiponectina en plasma: los ácidos grasos aumentaron luego de la ingesta de DRS y disminuyeron los niveles de adiponectina.

Una mayor disponibilidad de lípidos plasmáticos como la observada en los animales alimentados con DRS contribuye al deterioro de la acción insulínica en tejidos sensibles a la acción de la hormona (resistencia insulínica periférica global). Al mismo tiempo una exposición crónica de las células  $\beta$  pancreática a niveles elevados de ácidos grasos y glucosa “in vitro” e “in vivo”, favorece su disfunción mediante un proceso de glucolipotoxicidad.

Varios mecanismos podrían contribuir a la disfunción de la célula  $\beta$ , entre ellos:

- cambios en la oxidación de la glucosa.
- incremento del contenido de triglicéridos.
- incremento en la síntesis de ceramidas.
- regulación negativa de diferentes genes (GLUT 2 y glucoquinasa).
- inducción de las proteínas desacoplantes UCP 2.
- inducción de stress oxidativo.
- disminución de la actividad quinasa dependiente de AMP (AMPK).



- estimulación de la expresión del factor de transcripción SREBP-1c.
- estimulación de la expresión del factor de transcripción PPARs.

Al respecto, hemos demostrado recientemente (Pighín y col, 2003] un incremento de los depósitos de triglicéridos y descenso de la actividad del complejo PDH dentro de las células  $\beta$  aisladas de animales alimentados con DRS por 270 días. La inhibición del complejo PDH limita la conversión del piruvato derivado de la glicólisis a acetil-CoA y disminuye el metabolismo oxidativo de la glucosa, una señal para la secreción y síntesis de insulina (Randle, 1998) (Man y col, 1997). Este podría ser uno de los mecanismos que contribuiría a la disfunción de la célula  $\beta$  en los animales alimentados crónicamente con DRS.

El significativo aumento en el tamaño y en el contenido de triglicéridos de los adipocitos observado en el grupo DRS estaría relacionado con un aumento de la síntesis de triglicéridos, vinculada a una mayor captación de ácidos grasos de las lipoproteínas circulantes (mayor reesterificación) sumado a una mayor actividad lipogénica “de novo” de ácidos grasos. Además, la cronicidad de la dieta conduce a una mayor lipólisis basal en el tejido adiposo que se asocia con un aumento de los ácidos grasos y alterados niveles plasmáticos de leptina y adiponectina. La captación de glucosa estimulada por insulina y la acción antilipolítica de la hormona se encuentran disminuidas evidenciando la pérdida de sensibilidad a la insulina por el adipocito. Esto se acompaña de una clara alteración del patrón de secreción de insulina (estimulada por glucosa) y de la resistencia insulínica periférica global.

En conclusión, la administración prolongada de una dieta rica en sacarosa a ratas normales induce cambios morfológicos, metabólicos y funcionales en el tejido adiposo blanco que pueden contribuir a los mecanismos de anormal homeostasis de la glucosa con resistencia



insulínica. La hipertrofia del tejido adiposo es la consecuencia de un aumento del contenido de triglicéridos, que podría deberse a: 1) un aumento de la síntesis de los mismos vinculada a una mayor captación de ácidos grasos de las lipoproteínas circulantes (mayor reesterificación) y 2) a una mayor actividad lipogénica (síntesis “de novo” de ácidos grasos).

El segundo objetivo del presente trabajo de tesis fue evaluar el efecto de cambios parciales en la composición grasa de la dieta (aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao) sobre todas las alteraciones metabólicas antes mencionadas.

La dislipidemia presente en los animales alimentados con dieta rica en sacarosa fue normalizada al modificar la fuente de grasa de la dieta. Esto se acompañó de una significativa disminución de las actividades de enzimas claves relacionadas con la lipogénesis en el tejido adiposo, de una marcada reducción de la masa grasa visceral y de la hipertrofia adipocitaria, mejorando al mismo tiempo la distribución celular.

Los posibles mecanismos involucrados en estos procesos incluirían la unión de los ácidos grasos n-3, ligandos naturales del factor de transcripción PPAR $\gamma$ s en el tejido adiposo. La presencia de los ácidos grasos n-3 en la dieta normaliza la lipólisis basal, la estimulada por isoproterenol y la acción antilipolítica de la insulina.

Es bien conocido que en los animales alimentados con DRS existe un incremento de los niveles hepáticos de triglicéridos, ya que la sacarosa es un potente inductor del factor de transcripción proteína-1 que une elementos reguladores de esteroles (SREBP-1c) presente en los genes que codifican enzimas involucradas en la lipogénesis hepática activando su transcripción (Miyazaki y Watanabe, 2004) (Horton y col, 2002). Numerosos estudios experimentales han demostrado que el aceite de pescado puede down-regular los niveles de mRNA en hígado para el SREBP-1c por mecanismos que incluyen la supresión de la transcripción génica y el



procesamiento proteolítico, disminuyendo la estabilidad del mRNA SREBP-1c e incrementando su degradación en los proteasomas (Fernández y West, 2005). Además, ratas alimentadas con aceite de pescado presentan mayor capacidad oxidativa hepática de los ácidos grasos (Neschen y col, 2002) posiblemente vía una regulación positiva del factor de transcripción PPAR  $\alpha$ .

Por lo tanto, a través de estos mecanismos que involucrarían al PPAR  $\alpha$  y SREBP-1c, los ácidos grasos n-3 (aceite de pescado, AHB) disminuirían los niveles de triglicéridos elevados (tanto en plasma como en hígado) que observamos en los animales alimentados crónicamente con DRS.

La reversión de la dislipemia observada en los animales con DRS + AHB podría ser uno de los mecanismos involucrados en la reducción de la hipertrofia celular del tejido adiposo. Otro posible mecanismo se relaciona con la disminución de las actividades de las enzimas lipogénicas en dicho tejido. Al respecto, Raclot y col (1997) y Haug y Hostmark (1987) demostraron en tejido adiposo de ratas normales alimentadas con dieta rica en grasa (22%) que incorporaron en la dieta ácidos grasos (11% aceite de pescado), una disminución de los niveles de mRNA y de las actividades de varias enzimas relacionadas con la lipogénesis, incluyendo FAS y LPL.

Los ácidos grasos n-3, especialmente el ácido eicosapentaenoico (EPA), se une y activa la expresión de los PPAR  $\gamma$ 2 (isoforma del PPAR) en tejido adiposo. La activación del PPAR  $\gamma$ 2 conduce a un incremento coordinado de un gran número de genes relacionados con la adipogénesis, transporte, depósito y oxidación de ácidos grasos en el tejido adiposo blanco (Rousseau y col, 1997), además de remodelar el tejido adiposo en las ratas adultas estimulando el desarrollo de adipocitos más pequeños y más sensibles a la acción insulínica. Al respecto, Peyron-Caso y col (2002 b) demostraron que los adipocitos de ratas Sprague-Dawley alimentadas con dieta rica en sacarosa adicionada de aceite de pescado durante 3 semanas, son de menor tamaño y más sensibles a la estimulación por la insulina que



aquellos aislados de ratas alimentadas por el mismo período de tiempo con dieta rica en sacarosa adicionada de aceite vegetal.

Los ácidos grasos actuarían en forma similar a la descrita para los fármacos antidiabéticos orales de la familia de las tiazolidinedionas (TZD), ligandos sintéticos de los PPAR $\gamma$  (Spiegelman, 1998) (Okuno y col, 1998).

La activación de los PPAR $\gamma$  induce además, la diferenciación de adipocitos del tejido adiposo marrón que tienen el potencial de disipar el exceso de energía en forma de calor (Rousseau y col, 1997) (Willson y col, 2001). Este mecanismo favorecería a la menor acumulación de grasa corporal causada por los ácidos grasos n-3. Además se ha demostrado que la estimulación del PPAR  $\gamma$  disminuye la producción adipocitaria de TNF- $\alpha$  lo que también contribuye a la mejora de la sensibilidad insulínica (Miles y col, 1997) (Peraldi y col, 1997).

Cuando la fuente de grasa de la dieta DRS (aceite de maíz) es parcialmente reemplazada por AHB, la lipólisis basal aumentada en el grupo DRS disminuyó significativamente. La adicción de AHB normalizó también la lipólisis estimulada por isoproterenol, alcanzando valores similares a los obtenidos para el grupo DC.

De acuerdo con nuestros resultados, Rustan y col (1998) mostraron una disminución de la lipólisis basal y estimulada en tejido adiposo epididimal y perirrenal de ratas alimentadas con dieta grasa saturada suplementada con ácidos grasos n-3 por 7 semanas comparada con el grupo alimentado con dieta grasa por el mismo período de tiempo.

Por otro lado, Parrish y col (1991) observaron una alta respuesta lipolítica a la noradrenalina en adipocitos de ratas alimentadas durante 3 semanas con aceite de pescado en comparación con aquellas alimentadas con grasa de cerdo (lard) por el mismo período de tiempo. Un incremento de la respuesta lipolítica a la adrenalina en adipocitos de ratas Wistar alimentadas con ácidos grasos n-3, comparada con aceite de girasol, fue





observado también luego de 7 días de administración de la dieta. Esto sugiere un efecto general de los ácidos grasos n-3 en modular los caminos de la cascada lipolítica, a nivel de los receptores adrenérgicos o de la actividad de la adenilato ciclasa, fosfodiesterasa o HSL (Fickova y col, 1998). Raclot y Groscolas (1993) demostraron, que bajo condiciones de lipólisis estimulada, los ácidos grasos insaturados y que tienen sus dobles enlaces más cerca del metilo terminal, son más rápidamente movilizados. La movilización diferencial estaría relacionada a una mayor solubilidad del ácido graso en la interfase lípido-agua donde la HSL hidroliza a los triglicéridos. Como resultado, estos estarían más accesibles a la enzima y, por lo tanto, a ser hidrolizados.

Nuestro estudio no provee datos sobre los procesos celulares responsables de la normalización de la lipólisis aumentada en los adipocitos de ratas del grupo DRS luego de la ingesta de AHB. Sin embargo, se ha demostrado que tanto la alimentación con fructosa como con sacarosa eleva la presión sanguínea, y este podría ser el mecanismo que activa el sistema nervioso simpático (Storlien y col, 1993 a), lo que contribuiría a aumentar la actividad lipolítica. Por otro lado, Huang y col (1997) demostraron que la administración por 3 semanas de aceite de pescado mejoraba la hipertensión inducida en ratas por la alimentación con fructosa. Esto influenciaría la lipólisis del tejido adiposo. Además, la significativa reducción del tamaño celular de los adipocitos contribuiría también a disminuir la lipólisis basal.

La administración de ácidos grasos n-3 normalizó la acción antilipolítica de la insulina y la captación de glucosa en el tejido adiposo de ratas alimentadas crónicamente con DRS. Al respecto, Vrăna y col (1988) demostraron el efecto beneficioso de los ácidos grasos n-3 sobre la acción insulínica en adipocitos aislados de ratas alimentadas durante 3 semanas con DRS. Además, Vrăna y col (1986) mostraron que la adición a una DRS de 1 mililitro de aceite de pescado por día aumenta la incorporación de glucosa a lípidos totales en adipocitos de ratas que recibieron esta dieta. En





el mismo modelo, Luo y col (1996) demostraron que la disminución en el transporte de glucosa estimulado por insulina, su oxidación y su incorporación a lípidos totales es prevenida cuando el aceite de pescado es la principal fuente de grasa de la DRS durante 6 semanas. También aquí, el incremento en la actividad del transportador de glucosa GLUT4 se acompañó de un aumento de la proteína y de sus niveles de mRNA. Al respecto, Peyron-Caso y col (2002 a) observaron un incremento en el transporte de glucosa estimulado por insulina en adipocitos, asociado a un incremento de la proteína GLUT4 y de sus niveles de mRNA en ratas alimentadas durante 3 semanas con DRS suplementada con aceite de pescado.

Por otro lado, hemos demostrado recientemente (Pighín y col, 2003) que la administración de ácidos grasos n-3 normaliza la secreción de insulina, bajo estímulo de la glucosa, de islotes aislados perifundidos. Los posibles mecanismos involucrados en este proceso incluyen una normalización de los depósitos de triglicéridos y de la oxidación de la glucosa en la célula  $\beta$ .

Además de la regulación de los niveles de los lípidos plasmáticos, otros mecanismos relacionados con los efectos de los ácidos grasos n-3 de origen marino sobre la acción insulínica involucrarían la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membranas en tejidos blanco a la acción de la hormona. Este sería un factor crítico que influenciaría la acción biológica de la insulina (por ejemplo: cambios en la fluidez de la membrana, función del DAG como segundo mensajero, etc.) (Storlien y col, 1991).

Las membranas de las vesículas intracelulares que contienen a los transportadores de glucosa GLUT 4 en las células adiposas, contienen la enzima sintetasa de ácidos grasos de cadena larga 1 y su producto, los acil-CoA (Sleeman y col, 1998). Estos acil-CoA son sustratos para la biosíntesis de fosfolípidos. Así, la translocación de los transportadores GLUT4 desde las vesículas intracelulares está influenciada por los lípidos que constituyen las membranas de las mismas, siendo estimulada por los fosfolípidos formados



por ácidos grasos polinosaturados e inhibida cuando los ácidos grasos son saturados (Sandra y col, 1984). De esta manera, un alto porcentaje del transporte de la glucosa está ligado a un incremento en la fluidez de la membrana, que facilita la penetración del GLUT4 en ella (Spector y Yorek, 1985) y/o induce cambios conformacionales en la estructura cuaternaria de la proteína. Además, un aumento en la fluidez de membrana está asociado a un mayor número de receptores de insulina y a una mayor sensibilidad a la acción de la hormona (Borkman y col, 1993) (Storlien y col, 1996) (Ginsberg y col, 1981) (Ghafoorunissa y col, 2005).

Recientemente hemos observado un incremento de ácidos grasos n-3 (EPA 20:5 y DHA 22:6) en los fosfolípidos del músculo esquelético de ratas alimentadas con DRS + AHB (n6/n3: 1.23 para DRS + AHB vs. 7.2 para DRS). En estos animales, la resistencia periférica insulínica global fue revertida ante la presencia de ácidos grasos n-3 en la dieta. Aunque en el presente trabajo no analizamos la composición de los ácidos grasos de la membrana de los adipocitos, es posible que cambios en el tipo de ácidos grasos que componen los fosfolípidos de sus membranas puedan contribuir al aumento en la captación de glucosa observada en ratas alimentadas con DRS + AHB y a la mayor sensibilidad a la insulina por los adipocitos. De acuerdo con esto, Luo y col. (1996) demostraron que la acción insulínica se correlaciona positivamente con el índice de insaturación de ácidos grasos en los fosfolípidos de membrana de los adipocitos de rata cuando el aceite de pescado representa la principal fuente de lípidos en dietas ricas en sacarosa durante 6 semanas.

La adición de aceite de pescado a la dieta rica en sacarosa durante los últimos 60 días de ingesta normaliza los niveles de leptina y adiponectina plasmáticos sin modificaciones en la expresión génica de ambas adipocitoquinas en los tejidos adiposos blancos. La naturaleza de los ácidos grasos de la dieta, independientemente de la masa de tejido adiposo, parece jugar un rol determinante de los niveles circulantes de leptina en plasma



(Cha y Jones, 1998). Al respecto, concentraciones elevadas de leptina en plasma se observaron en ratas normales alimentadas con 20% de aceite de pescado durante 10 semanas comparadas con ratas alimentadas con beef tallow.

Aunque las ratas alimentadas con DRS presentan una deficiencia, y/o posible resistencia a la leptina, el incremento en los niveles de leptinemia, que se mantienen dentro del rango de los valores controles luego de la administración de AHB, no puede ser considerado como una resistencia a la leptina. Estos niveles de leptina contribuirían a mantener el peso corporal y a limitar el incremento de algunos depósitos grasos en las ratas alimentadas con DRS. Estos resultados sugieren que los efectos de la leptina en regular el peso corporal y la masa del tejido adiposo no pueden explicarse solamente por variaciones en la ingesta calórica. Dentro de este contexto, esta regulación estaría mediada por la habilidad de la leptina en promover la hidrólisis de triglicéridos y oxidación de ácidos grasos e inhibir su síntesis (Steinberg y col, 2002) (Reidy y Weber, 2002). Más aún, los efectos de la leptina sobre la masa grasa pueden también estar mediados por un incremento en el gasto energético a través de un aumento de la termogénesis en el tejido adiposo marrón (Dhillon y col, 2001) (Scarpace y col, 1997). Luego de su unión a los receptores hipotalámicos, la leptina inhibe la secreción del neuropéptido Y y estimula la liberación de la hormona melanocito estimulante, la cual incrementa el gasto energético a través de las proteínas desacoplantes UCP 1 del tejido adiposo marrón (Morrison, 2004).

Por lo tanto, al favorecer la utilización de los lípidos como fuente de energía, la leptina podría prevenir el desarrollo de la masa grasa. Nuestros resultados mostraron que el aumento de la leptinemia por el AHB está asociado a una disminución de la actividad de las enzimas lipogénicas (FAS, ACC, ME, G6PDH, LPL) pero no a una estimulación de la lipólisis *in vitro*.



En el presente trabajo, el incremento en los niveles plasmáticos de leptina no se correlaciona con variaciones de la expresión génica del *ob* en tejido adiposo blanco. Otros estudios (De Vos y col, 1996) (Reseland y col, 2001), sin embargo, encuentran que la alimentación con aceite de pescado por 3 semanas o por 3 meses podrían reducir el mRNA para el gen *ob*. Estos resultados no contradicen los presentes hallazgos, ya que una ligera aunque no significativa disminución en el mRNA para el gen *ob* se encontró en las ratas alimentadas con DRS + AHB. Esto sugiere que un incremento en la leptina plasmática sería consecuencia de un incremento en la secreción por parte del adipocito más que a incremento en su síntesis.

Muchos estudios demostraron que la leptina mejora la resistencia insulínica en adipocitos de ratas (Sivitz y col, 1997) y que estimula el transporte de glucosa en el adipocito (Barzilai y col, 1997) (Haque y col, 1999) y en el músculo esquelético (Furnsinn y col, 1998). De acuerdo a Barzilai y col (1999) ésta sensibilidad aumentada de los adipocitos a la acción de la insulina sería debido a una acción directa de la leptina. Por lo tanto, el incremento en los niveles de leptina podría ser la causa y no la consecuencia del mejoramiento de la resistencia insulínica como también de la homeostasis de lípidos y glucosa, observada en los animales alimentados con DRS + AHB.

La insulina estimula la secreción y la expresión del gen de la leptina (Rosenbaum y col, 1996) (Wabitsch y col, 1996) (Boden y col, 1997) (Caro y col, 1996). Aunque los niveles plasmáticos de insulina no cambiaron, sí se observó una mayor sensibilidad a la acción de la insulina por las células adiposas. Esto coincide con numerosos estudios que demostraron que el transporte y metabolismo de la glucosa en el adipocito son factores importantes en la regulación de la expresión y secreción de leptina y que el efecto de la insulina en incrementar la utilización de la glucosa en la célula adiposa podría contribuir a la secreción de leptina estimulada por la hormona (Mueller y col, 1998) (Nyholm y col, 1997).



Estudios recientes sugieren complejas interacciones entre la leptina y la vía de señales de la insulina, que potencialmente podrían llevar a modificaciones diferenciales de los efectos metabólicos de la hormona ejercidos a través de los receptores IRS1 e IRS2 (Frühbeck y col, 2001). Consecuentemente esto puede incrementar la sensibilidad insulínica periférica global vía efectos periféricos sobre los tejidos sensibles a la acción de la hormona (hígado, músculo y tejido adiposo) (Zhou y col, 1997) (Greenberg y col, 1999).

Pighín y col (2003) observaron una disminución del contenido de triglicéridos pancreático y hepático en ratas alimentadas crónicamente con DRS en la que se reemplazó la fuente de grasa de la dieta (aceite de maíz por AHB). En el mismo modelo experimental, D'Alessandro y col (2000) observaron también una disminución de los triglicéridos en músculo esquelético. Estos efectos podrían estar mediados por la acción de la leptina activando la quinasa dependiente de AMP cíclico a través de un efecto directo sobre el músculo esquelético e indirectamente a través del eje hipotálamo-sistema nervioso simpático (Minokoshi y col, 2002). Además debemos considerar que los ácidos grasos n-3 de origen marino favorecen la oxidación de los ácidos grasos en el hígado induciendo la expresión de genes involucrados en este proceso, a través del PPAR  $\alpha$  (Neschen y col, 2002) (Clarke, 2001).

La administración de ácidos grasos n-3 normaliza los niveles de adiponectina plasmáticos en ratas alimentadas crónicamente con DRS. Más aún, en un trabajo reciente (Rossi y col, 2005) hemos demostrado que la administración simultánea de aceite de pescado y sacarosa durante un período corto de tiempo (3 semanas) permitía prevenir la disminución de los niveles plasmáticos de adiponectina inducidos por la DRS.

La incorporación de ácidos grasos n-3 dietarios probablemente incremente las concentraciones de adiponectina en plasma a través de la activación selectiva de los PPAR y en tejido adiposo, ya que estos factores de



transcripción regulan la síntesis y secreción de esta adipocitoquina (Gustafson y col, 2003). Estos resultados están de acuerdo con el ya demostrado incremento de la adiponectina en plasma, y consecuente mejora en la sensibilidad insulínica, luego del tratamiento durante 6 meses con agentes como las rosiglitazonas (Yu y col, 2002), miembros de la familia de las thiazolidinedionas, agonistas de los PPAR y (Coort y col, 2005).

Los mecanismos implicados en los cambios de los niveles en plasma de adiponectina todavía no son claros. Algunos estudios encontraron que la expresión de adiponectina en las células grasas incrementa en paralelo con el incremento de la sensibilidad insulínica y pérdida de peso (Yang y col, 2001). En contraste con esto, Milan y col (2002) observaron que las modificaciones en los niveles plasmáticos de la adipocitoquina no estaban asociadas con un incremento en la expresión del mRNA para adiponectina.

Por otro lado, los niveles elevados de ácidos grasos en el plasma de la DRS podrían ejercer un efecto inhibitorio de la secreción de adiponectina por la célula grasa. La normalización de los ácidos grasos por la administración del AHB podría eliminar este efecto inhibitorio. Además, el efecto de la DRS o DRS + AHB sobre el tamaño celular y por lo tanto sobre la sensibilidad a la insulina por el adipocito, puede también ser otro mecanismo involucrado en la regulación de la adiponectina plasmática.

En conclusión, la administración de ácidos grasos n-3 a ratas dislipémicas insulino resistentes, disminuye los niveles de triglicéridos y ácidos grasos plasmáticos y puede inducir una modificación selectiva en ciertos tejidos adiposos, modulando el tamaño del adipocito y de esta manera, incrementando la sensibilidad insulínica por otros mecanismos. Los adipocitos sensibilizados a la insulina, en ausencia de altos niveles de triglicéridos y ácidos grasos, secretarían más leptina y adiponectina. Estas adipocitoquinas podrían estar involucradas en la mayor sensibilidad periférica global a la insulina.



## **CONCLUSIONES**

El estilo de vida moderno - abundante suministro de nutrientes y reducida actividad física - ha contribuido, junto con el factor genético, a un dramático incremento de las enfermedades metabólicas, relacionadas estrechamente con la calidad de los macronutrientes de la dieta. Esto se asocia a un aumento de obesidad, DMNID, hipertensión, dislipemia, enfermedad cardiovascular, etc, todas ellas incluidas en el denominado Síndrome X.

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 en general. En la investigación básica se utilizan diferentes modelos experimentales nutricionales que se asemejan, en diferentes aspectos bioquímicos-metabólicos, a los descritos en Síndrome X y que, a pesar de sus limitaciones en la extrapolación al humano de los resultados obtenidos, resultan sumamente útiles para estos fines.

En este trabajo de tesis, utilizando el modelo nutricional de dislipemia y resistencia insulínica logrado a través de la administración crónica de una dieta rica en azúcares refinados, analizamos el rol del tejido adiposo en estos desórdenes metabólicos y demostramos que cumple un rol clave en las alteraciones funcionales y metabólicas presentes en el modelo. Más aún, cambios en uno de los macronutrientes de la dieta (lípidos) como lo es la sustitución parcial del tipo de ácido graso (n-6 de origen vegetal por



n-3 de origen marino), logran modificar favorablemente las anomalías metabólicas antes descritas.

## **RESUMEN**

El Síndrome X o Plurimetabólico, integrado por una constelación de anormalidades tales como diabetes, hipertensión, dislipemia, insulino resistencia y enfermedad coronaria, tiene gran incidencia en la comunidad. Los mecanismos íntimos no están aún bien dilucidados, haciendo necesario orientar los esfuerzos para tratar de ampliar las bases científicas de dichos desórdenes, con el objeto de prevenir o mejorar las condiciones de salud de la población en general. Experimentalmente es posible lograr un modelo similar al del Síndrome X por manipulación dietaria, por ejemplo a través de la administración de una dieta rica en sacarosa (DRS) o en grasas saturadas.

El tejido adiposo es hoy reconocido por diferentes autores como un tejido clave en la resistencia insulínica y por ende en el Síndrome X relacionado a ella (Arner, 2003). Dado el importante rol metabólico y funcional del tejido adiposo sobre los lípidos plasmáticos, la homeostasis de la glucosa y la resistencia insulínica, los objetivos generales del presente trabajo de tesis fueron: 1) Analizar algunos mecanismos que relacionen cambios morfológicos, funcionales y moleculares del tejido adiposo en el modelo experimental de dislipidemia y resistencia insulínica inducido por la administración prolongada de una dieta rica en sacarosa, 2) Determinar de que manera estos cambios contribuyen a la hiperglucemia, resistencia insulínica y dislipidemia, y 3) Analizar si una sustitución parcial en el tipo de ácidos grasos de la dieta (aceite de maíz –rico en ácidos grasos n-6- por





aceite de hígado de bacalao - rico en ácidos grasos n-3) contribuye a mejorar y/o revertir estas anormalidades metabólicas.

A través de los resultados del presente trabajo de tesis, pudimos constatar en el grupo experimental (alimentado con una dieta rica en sacarosa durante 270 días): a) Expansión de la masa del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal (hipertrofia) y anormal distribución del tamaño celular de los adipocitos, alteraciones que se acompañan de un moderado incremento de la ingesta calórica y del peso corporal (aproximadamente 18%) correlacionándose también con un mayor contenido lipídico de la carcasa. b) Mayor lipólisis basal; c) Disminuida acción antilipolítica de la insulina; d) Menor captación de glucosa estimulada por la insulina en adipocitos aislados e) Incremento en las actividades de las enzimas lipogénicas y de la lipoproteína lipasa; f) Disminución de los niveles de leptina y adiponectina en plasma sin cambios en la expresión génica de estas adipocitoquinas en tejido adiposo blanco g) Deterioro del patrón bifásico de secreción de insulina (estimulado por la glucosa) en islotes perifundidos, con pérdida del primer pico de secreción y una segunda fase hipersecretora.

La sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria de aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao (AHB) durante los últimos 60 días de experiencia (grupo alimentado con dieta rica en sacarosa con AHB como principal fuente de grasa dietaria), indujo: a) Disminución significativa en la adiposidad visceral y del contenido graso de la carcasa; b) Disminución de las actividades de las enzimas relacionadas con la lipogénesis respecto del grupo DRS; c) Reducción de la hipertrofia de los adipocitos asociada a una distribución del tamaño celular que se aproxima a la observada en animales alimentados con DC; d) Normalización de la lipólisis basal. e) El efecto hipolipemiente del AHB, logró revertir la resistencia insulínica periférica global y del tejido adiposo; f) Normalización del patrón de secreción de insulina bajo el estímulo de la glucosa, en islotes aislados perifundidos. g)



Normalización de los niveles plasmáticos de leptina y adiponectina sin cambios en la expresión génica de dichas adipocitoquinas.

En conclusión, el tejido adiposo cumple un rol clave en las alteraciones funcionales y metabólicas presentes en el modelo experimental de dislipidemia y resistencia insulínica inducido por una dieta rica en azúcares refinados. Cambios en uno de los macronutrientes de la dieta (lípidos) como lo es la sustitución parcial del tipo de ácido graso (n-6 de origen vegetal por n-3 de origen marino), logran modificar favorablemente las anomalías metabólicas antes descriptas.

## **SUMMARY**

Both genetic and environmental factors (eg. nutrition, life style) contribute to develop several metabolic disorders such as cardiovascular disease, hypertriglyceridemia, insulin resistance, hypertension, impaired glucose homeostasis, type 2 diabetes mellitus and obesity. All these metabolic abnormalities constitute the so called Plurimetabolic Syndrome or Syndrome X which has a high prevalence in the world population and is one of the toughest challenges in human health in the 21<sup>st</sup> century.

Experimentally, is possible to induce a nutritional model by dietary manipulation that resemble in several aspects to the Syndrome X (eg. by chronic administration of sucrose (SRD) or high fat diets).

Nowadays, adipose tissue is well recognized as one of the key factor in the development of Syndrome X, playing an important metabolic role in the regulation of plasma lipids level, glucose homeostasis and insulin sensitivity. In the present work we investigate: 1) The morphological, functional and molecular changes induced in adipose tissue of rats fed chronically (270 days) a sucrose rich diet, 2) How this changes contribute to the hyperglycaemia, insulin resistance and dislipidemia present in this animal model and 3) If the partial substitution of the source of dietary fat



(corn oil- rich in n-6 fatty acids- by cod liver oil- rich in n-3 fatty acids) could normalize and/or improve these metabolic abnormalities.

The results obtained in the present work; show that rats fed a SRD during 270 days develop: a) Visceral adiposity with increase fat pad mass and abnormal cell size distribution. These alterations were accompanied by a moderate increase of caloric intake and body weight, as well as carcass lipid content. b) Isolated adipocytes show an enhanced basal lipolysis and both c) Diminished antilipolytic action of insulin and insulin stimulated glucose uptake, d) Increased enzymatic activities of lipogenic enzymes and lipoprotein lipase; e) Diminished plasmatic leptin and adiponectin levels without changes in white adipose tissue mRNA gene expression, f) Deteriorate biphasic patterns of glucose-stimulated insulin secretion from perfused islets with absence of the first peak and increased second phase of hormone secretion.

The partial substitution of dietary source of fat from corn oil to cod liver oil during the last 60 days of the experimental period (group fed a sucrose rich diet with cod liver oil as the principal source of fat), caused: a) Reduction of fat pads mass and hypertrophy of fat cells, improving the altered cell size distribution and carcass fat content, b) Reduction of the “in vitro” enhanced basal lipolysis and normalization of isoproterenol-stimulated lipolysis. c) Correction of the inhibitory effect of high sucrose diet upon the antilipolytic action of insulin, and normalization of insulin stimulated glucose uptake d) Reduction of fat pads lipogenic enzymes activities, and e) Improvement of the peripheral insulin resistance; with f) normalization of the glucose-stimulated insulin secretion patterns in perfused pancreatic islets. g) Even more, cod liver oil caused an increase in plasma levels of leptin and adiponectin without changes in white adipose tissue mRNA gene expression,

In conclusion, the adipose tissue has a key role in functional and metabolic alterations present in an experimental model of dyslipidemia and insulin resistance induced by a refined sugar rich diet. Changes in one



macronutrient of the diet (lipids) as is the partial substitution of the type of fatty acid (n-6 from vegetal source for n-3 from marine source), can improve the metabolic abnormalities previously described.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abella A, Marti L, Camps M, Claret M, Fernández-Alvarez J, Gomis R, Guma A, Viguerie N, Carpéné C, Palacín M, Testar X and Zorzano A. (2003) Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase/Vascular Adhesion Protein-1 Activity Exerts an Antidiabetic Action in Goto-Kakizaki Rats. *Diabetes*, 52:1004–1013.
- Agheli N, Kabir M, Berni-Canani S, Petijean E, Boussairi A, Luo J, Bornet F, Slama G and Rizkalla S. (1998) Plasma lipids and Fatty Acid Synthase activity are regulated by short-chain fructo-oligosaccharides in sucrose-fed insulin-resistant rats. *J.Nutr*, 128: 1283-1288.
- Aguilera AA, Diaz GH, Barcelata ML, Guerrero OA and Ros RM. (2004) Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem*, 15(6): 350-357.
- Ahren B, Mansson S, Gingerich RL and Havel P J. (1997) Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 273: 113-120.



- Ahrens EH, Hirsch J, Oette K, Farquhar JW and Stein Y. (1961) Carbohydrate-induced and fat-induced lipemia. *Trans Med Soc Lond*, 74: 134-146.
- Ailhaud G, Grimaldi P and Negrel R. (1992) Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Ann Rev Nutr*, 12: 207-233.
- Aninil 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, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T and Matsuzawa Y. (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 257: 79-83.
- Arner P. (2003) The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14: 137-145.
- Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoke R and Morley JE. (2004) Triglycerides Induce Leptin Resistance at the Blood-Brain Barrier *Diabetes*, 53: 1253-1260.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A and Evans RM. (1999) PPAR  $\gamma$  is required for placental, cardiac and adipose tissue development. *Mol Cell*, 4: 585-595.
- Barzilai N, Wang J, Massilon D, Vuguin P, Hawkins M and Rossetti L. (1997) Leptin Selectively Decreases Visceral Adiposity and Enhances Insulin Action. *J Clin Invest*, 100: 3105-3110.
- Barzilai N, She L, Liu L, Wang J, Hu M, Vuguin P and Rossetti L. (1999) Decreased visceral adiposity accounts for leptin effect on



hepatic but not peripheral insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 277: 291-298.

- Beaty NB and Lane MD (1983) Kinetics of activation of acetyl-CoA carboxylase by citrate. Relationship to the rate of polymerization of the enzyme. *J Biol Chem*, 258: 13043-13050.
- Belahsen R and Deshaies Y. (1993) Involvement of insulinemia in the postprandial hypotriacylglycerolemia induced by prazosin in the rat. *Metabolism*, 42:1301-1309.
- Bell KS, Scmitz-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*, 279: 1196-1201.
- Bergman RN, Van Citters GW, Mittelman SD, Dea MK, Hamilton-Wessler M, Kim SP and Ellmerer M. (2001) Central role of the adipocyte in the metabolic syndrome. *J Invest Med*, 49(1): 119-126.
- Bergmeyer HU. (1974) Methods for determination of metabolites. *Methods of Enzymatic Analysis* (2nd ed.), editado por Bergmeyer, H.U. New York: Academic, 1100-2110.
- Berk PD, Zhou S-L, Kiang C-L, Stump D, Bradbury M and Isola LM. (1997) Uptake of Long Chain Free Fatty Acids Is Selectively Up-regulated in Adipocytes of Zucker Rats with Genetic Obesity and Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. *J Biol Chem*, 272: 8830-8835.
- Berk PD, Zhou SL, Kiang CL, Stump DD, Fan X and Bradbury MW. (1999) Selective Up-regulation of Fatty Acid Uptake by Adipocytes Characterizes Both Genetic and Diet-induced Obesity in Rodents. *J Biol Chem*, 274: 28626-28631.



- Bernal C, Gutman R and Lombardo YB. (1995) The duration of feeding on a sucrose-rich diet determines variable in vitro effects of insulin and fructose in rat liver triglyceride metabolism. *J Nutr Biochem*, 6: 422-430.
- Best y Taylor. (1991) *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*. 12<sup>a</sup> Edición. Editorial Médica Panamericana S.A.
- Bjorntorp P and Sjostrom L. (1972) The composition and metabolism in vitro of adipose tissue fat cells of different sizes. *Eur J Clin Invest*, 2: 78-84.
- Blakely SR, Hallfrish J and Reiser S (1982) Long-term effects of moderate fructose feeding on lipogenic parameters in Wistar rats. *Nutr Rep Int*, 25: 675-685.
- Blakely SR, Akintilo AO and Pointer RH. (1987) Effects of fructose, levamisole and vanadate on insulin action in rat adipose tissue. *J Nutr*, 117(3): 559-566.
- Blazquez E and Lopez Quijada C (1964) The effect of a high-carbohydrate diet on glucosa, insulin sensitivity and plasma insulin in rats. *J Endocr*, 44: 107-113.
- Bluher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB and Kahn CR. (2002) Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell*, 3(1): 25-38.
- Boden G. (1996) Fatty acids and insulin resistance. *Diabetes Care*, 19: 394-395.
- Boden G, Chen X, Kolaczynski JW and Polansky M. (1997) Effects of Prolonged Hyperinsulinemia on Serum Leptin in Normal Human Subjects. *J Clin Invest*, 100: 1107-1113.



- Bonner-Weir S, Trent DF, Money RN and Weir GC. (1981) Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited  $\beta$ -cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes*, 30: 64-69.
- Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ and Campbell LV. (1993) The Relation between Insulin Sensitivity and the Fatty-Acid Composition of Skeletal-Muscle Phospholipids. *N Engl J Med*, 328: 238-244.
- Bray GA. (1977) The Zucker fatty rat: a review. *Fed Proc*, 36: 148-153.
- Brownsey RW and Denton RM. (1982) Evidence that insulin activates fat-cell acetyl-CoA carboxylase by increased phosphorylation at a specific site. *Biochem J*, 202: 77-86.
- Brownsey RW, Hughes WA and Denton RM. (1979) Adrenaline and the regulation of acetyl-CoA carboxylase in rat epididimal adipose tissue. Inactivation of the enzyme is associated with phosphorylation and can be reversed on dephosphorylation. *Biochem J*, 184: 23-32.
- Brun RP and Spiegelman BM (1997) PPAR gamma and the molecular control of adipogenesis. *J Endocrinol*, 155: 217-218.
- Burnol A, Ferre P, Leturque A and Girard J. (1984) Technics for studying insulin resistance in vivo. *Ann Endocrinol (Paris)*, 45(6): 375-379.
- Burr IA, Stanttacher W, Balant L, Renold AE, Grodsky GM (1969) Regulation of insulin release in perfused pancreatic tissue. *Acta Diabet Lat*, 6: (Suppl 1): 580.
- Cammisotto PG, Gélinas Y, Deshaies Y and Bukowiecki LY. (2003) Regulation of leptin secretion from white adipocytes by free fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285: 521-526.





- Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL and Considine RV. (1996) Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes*, 45: 1455-1462.
- Cha MC and Jones PJH. (1998) Dietary fat type and energy restriction interactively influence plasma leptin concentration in rats. *J Lipid Res*, 39: 1655-1660.
- Chicco A, Gutman R and Lombardo YB. (1990) Biochemical abnormalities in the heart in rats with nutritionally induced hypertriglyceridemia and insulin resistance. *Frontiers in Diabetes Research. Lessons from animal Diabetes III- Editors E. Shafrir, Smith Gordon and Company Limited (London), Chapter XIII: 650-655.*
- Chicco A, Gutman R and Lombardo YB. (1991) Biochemical abnormalities in the heart of rats fed a sucrose-rich diet: is the low activity of the pyruvate dehydrogenase complex a result of increased fatty acid oxidation? *Metabolism*, 40(1): 15-21.
- Chicco A, Bernal C, Soria A, Giangrossi G and 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 and Lombardo YB. (2000) Troglitazone (CS-045) normalizes hypertriglyceridemia and restores the altered patterns of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipidemic rats. *Metabolism*, 49: 1346–1351.
- Chicco A, D'Alessandro ME, Karabatas L, Pastorale C, Basabe JC and Lombardo YB. (2003) Muscle Lipid Metabolism and Insulin Secretion Are Altered in Insulin-Resistant Rats Fed a High Sucrose Diet. *J Nutr*, 133: 127-133.



- Chunli Y, Chen Y, Cline GW, Ahang D, Zong H, Wang Y, Bergerson R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW and Shulman GI. (2002) Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) - associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem*, 277: 50230-50236.
- Ciaraldi, TP. (1989) Neuraminidase treatment of isolated rat adipocytes and differential regulation of basal and insulin-stimulated glucose transport. *Diabetes*, 38:951-58.
- Clamp AG, Ladha S, Clark DC, Grimble RF and Lund EK. (1997) The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. *Lipids*, 32(2): 179-84.
- Clarke SD. (2001) Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Transcription: A Molecular Mechanism to Improve the Metabolic Syndrome. *J Nutr*, 131: 1129-1132.
- Cohen AM, Briller S and Shafrir E. (1972) Effects of long term sucrose feeding on the activity of some enzymes regulating glicólisis, lipogénesis and gluconeogénesis in rat liver and adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*, 279:129-138.
- Cooney G, Thompson A, Furler S, Ye J and Kraegen E. (2002) Muscle Long-Chain Acyl CoA Esters and Insulin Resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 967:196-207.
- Coort SLM, Coumans WA, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JFC and Luiken JJFP. (2005) Divergent effects of rosiglitazone on protein-mediated fatty acid uptake in adipose and in muscle tissues of Zucker rats. *J Lipid Res*, 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, Karabatas L and Lombardo YB. (2000) Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil. *J Nutr Biochem*, 11: 273–280.
- D'Alessandro ME, Chicco A and Lombardo YB. (2006) A long-term sucrose-rich diet increases diacylglycerol content and membrane nPKC  $\theta$  expression and alters glucose metabolism in skeletal muscle of rats. *Nutrition Research*, 26: 289-296.
- Das U. (2002) Is Metabolic Síndrome X an Inflammatory Condition?. *Experimental Biology and Medicine*, 227:989-997.
- Davidson M and Karjala R. (1970) Simplified fluorometric method for the determination of plasma glycerol. *Journal of Lipid Research*, 11: 609-612.
- De Fronzo RA, Tobin JD and Andres R. (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*, 237: 214-223.
- De Vos P, Lefebvre A, Miller SG, Guerre-Millo M, Wong K, Saladin R, Hamann LG, Staels B, Briggs M and Auwerx J. (1996) Thiazolidinediones Repress ob Gene Expression in Rodents Via Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor. *J Clin Invest*, 98: 1004-1009.
- Dea MK, Van Citters GW, Ader M, Mittelman SD, Sunehag AL and Bergman RN. (2000) Paradoxical effect of troglitazone in normal



animals: enhancement of adipocyte but reduction of liver insulin sensitivity. *Diabetes*, 49: 2087-2093.

- Delporte ML, Funahashi T, Takahashi M, Matsuzawa Y and Brichard SM. (2002) Pre- and post-translational negative effect of beta-adrenoceptor agonists on adiponectin secretion: in vitro and in vivo studies. *Biochem J*, 367(Pt 3): 677-685.
- Deshaies Y. (1986) Plasma lipoprotein cholesterol and triglycerides and lipoprotein lipase activity in epididymal white adipose tissue of rats fed high sucrose or high corn oil diets. *Can J Physiol Pharmacol*, 64: 885–891.
- Dhillon H, Kalra SP, Prima V, Zolotukhin S, Scarpace PJ, Moldawer LL, Muzyczka N and Kalra PS. (2001) Central leptin gene therapy suppresses body weight gain, adiposity and serum insulin without affecting food consumption in normal rats: a long-term study. *Regul Pept*, 99(2-3): 69-77.
- Di Girolamo M, Mendlinger S and Fertig, JW. (1971) A simple method to determinate fat cell size and number in four mammalian species. *Am J Physiol*, 221: 850–858.
- Din JN, Newby DE and Flapan AD. (2004) Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease—fishing for a natural treatment. *BMJ*, 328: 30-35.
- Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S and Anania FA. (2005) The Roles of Leptin and Adiponectin: A Novel Paradigm in Adipocytokine Regulation of Liver Fibrosis and Stellate Cell Biology. *Am J Pathol*, 166: 1655-1669.
- Dole VP and Meinertz H. (1960) Microdetermination of Long-chain Fatty Acids in Plasma and Tissues. *J Biol Chem*, 235: 2595 - 2599.



- Doolittle MH, Ben-Zeev O, Elovson J, Martin D and Kirchgessner TG. (1990) The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *J Biol Chem*, 265: 4570-4577.
- Faraj M, Sniderman AD and Cianflone K. (2004) ASP enhances in situ lipoprotein lipase activity by increasing fatty acid trapping in adipocytes. *J Lipid Res*, 45: 657 - 666.
- Farese RV, Standaert ML, Yamada K, Huang LC, Zhang C, Cooper DR, Wang Z, Yang Y, Suzuki S, Toyota T and Lerner J. (1994) Insulin-induced activation of glycerol-3-phosphate acyltransferase by a chiro-inositol-containing insulin mediator is defective in adipocytes of insulin-resistant, type II diabetic, Goto-Kakizaki rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:11040–11044.
- Farmer SR. (2005) Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis. *Int J Obes (Lond)*, 29 Suppl 1: S13-S16.
- Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M and Paschke R (2002) Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(3): 1084-1089.
- Fernandez ML and West KL. (2005) Mechanisms by which Dietary Fatty Acids Modulate Plasma Lipids. *J Nutr*, 135: 2075-2078.
- Ferré P (2004) The Biology of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Relationship With Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity. *Diabetes*, 53: S43-S50.
- Fickova M, Hubert P, Crémel G and Leray C. (1998) Dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids rapidly modify fatty acid composition and insulin effects in rat adipocytes. *J Nutr*, 128: 512–519.



- Folch J, Lees M and Sloane-Stanley GH. (1957) A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226: 497-509.
- Frayn KN. (2001) Adipose Tissue and the Insulin Resistance Syndrome. *Proceeding of the Nutrition Society*, 60: 375-380.
- Fredholm BB (1981) Adenosine and lipolysis. *Intl J Obesity*, 5:643-649.
- Fried SK, Russell CD, Grauso NL and Brodin RE (1993) Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissue of obese women and men. *J Clin Invest*, 92: 2191-2198.
- Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ and Burrell MA. (2001) The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280: 827-847.
- Furnsinn C, Brunmair B, Furtmuller R, Roden M, Englisch R and Waldhausl W. (1998) Failure of leptin to affect basal and insulin-stimulated glucose metabolism of rat skeletal muscle in vitro. *Diabetologia*, 41(5): 524-529.
- Furuta M, Yano Y, Gabazza EC, Araki-Sasaki R, Tanaka T, Katsuki A, Hori Y, Nakatani K, Sumida Y and Adachi Y. (2002) Troglitazone improves GLUT4 expression in adipose tissue in an animal model of obese type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 56(3): 159-171.
- Gagliardino JJ, Olivera EM, Barragan H and Puppo RA. (1993) A simple economic evaluation model for selecting diabetes health care strategies. *Diabet Med*, 10(4): 351-354.



- Ghafoorunissa AI, Rajkumar L and Acharya V. (2005) Dietary (n-3) Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids Prevent Sucrose-Induced Insulin Resistance in Rats. *J Nutr*, 135: 2634-2638.
- Gilbert M, Magnan C, Turban S, André J, Guerre-Millo M. (2003) Leptin receptor-deficient obese Zucker rats reduce their food intake in response to a systemic supply of calories from glucose. *Diabetes*, 52: 277-282.
- Ginsberg BH, Brown TJ, Simon I and Spector AA. (1981) Effect of the membrane lipid environment on the properties of insulin receptors. *Diabetes*, 30: 773-780.
- Goldrick RB. (1967) Morphological changes in adipocyte timing of fat deposition and mobilization. *Am J Physiol*, 212: 777-782.
- Goto YM, Kakizaki T, Toyota T, Masaki N, Kitahara A, Yagihashi S and Kimura T. (1977) Spontaneous diabetes produced by repeated selective breeding of normal Wistar rats. In: Bajaj JS, ed. *Diabetes*. Amsterdam: Excerpta Medica, 703-710.
- Green A and Newsholme EA (1979) Sensitivity of glucose uptake and lipolysis of white adipocytes of the rat to insulin and effects of some metabolites. *Biochem J*, 180: 365-370.
- Greenberg JA and Bóxer CN. (1999) The leptin-fat ratio is constant, and leptin may be part of two feedback mechanisms for maintaining the body fat set point in non-obese male Fischer 344 rats. *Horm Metab Res*, 31(9): 525-532.
- Gries FA, Berger M, Neumann M, Preiss H, Liebermeister H, Hesse-Wortmann C, Jahnhe K (1972) Effects of norepinephrine, theophylline and dibutiryl cyclic AMP on “in vitro” lipolysis of human adipose tissue in obesity. *Diabetologia*, 8: 75-83.



- Grimaldi PA. (2001) The roles of PPARs in adipocyte differentiation. *Progress in Lipid Research*, 40: 269-281.
- Gustafson B, Jack MM, Cushman SW and Smith U. (2003) Adiponectin gene activation by thiazolidinediones requires PPAR gamma 2, but not C/EBP alpha-evidence for differential regulation of the aP2 and adiponectin genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 308(4): 933-939.
- Gutman R, Basílico MZ, Bernal C, Chicco A and Lombardo YB. (1987) Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically and isocaloric sucrose rich diet. *Metabolism*, 36: 1013–1020.
- Gutman R, Basílico MZ, Chicco A, Rodi MA, Nusimovich B and Lombardo YB. (1985a) Effects of tiadenol and clofibrate on plasma post heparin lipolytic hepatic, extrahepatic and monoglyceride hydrolase activities in rats with hypertriglyceridemia induced by a sucrose rich diet. *Horm Metab Res*, 17: 169-175.
- Gutman R, Basílico MZ, Mocchiutti N, Chicco A and Lombardo YB. (1985b) Diazoxide prevents the development of hormonal and metabolic abnormalities present in rats fed a sucrose rich diet. *Horm Metab Res*, 17: 491-494.
- Halestrap A and Denton R. (1973) Insulin and the Regulation of Adipose Tissue Acetyl-Coenzyme A Carboxylase. *Biochem J*, 132: 509-517.
- Halvorsen B, Rustan AC, Madsen L, Reseland J, Berger K, Sletnes P and Christiansen EN. (2001) Effects of long-chain monounsaturated and n-3 fatty acid oxidation and lipid composition in rats. *Ann Nutr Metab*, 45: 30-37.





- Haque MS, Minokoshi Y, Hamai M, Iwai M, Horiuchi M and Shimazu T. (1999) Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes*, 48: 1706-1712.
- Harris WS, Hustvedt BE, Hagen E, Green MH, Lu G and Drevon CA. (1997) N-3 fatty acids and chylomicron metabolism in the rat. *J Lipid Res*, 38: 503 -515.
- Haug A and Hostmark AT. (1987) Lipoprotein lipases, lipoproteins and tissue lipids in rats fed fish oil or coconut oil. *J Nutr*, 117: 1011–1017.
- Hausberger FX. (1967) Effect of dietary and endocrine factors on adipose tissue growth. In: *Handbook of Physiology. Adipose Tissue*. Washington, DC: Am Physiol Soc, sect. 5, chapt. 52, p. 519-528.
- Havel PJ. (2000) Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc Nutr Soc*, 59:359 –371.
- Havel PJ. (2004) Update on Adipocyte Hormones: Regulation of Energy Balance and Carbohydrate/Lipid Metabolism. *Diabetes*, 53: S143-S151.
- Herberg L, Gries FA and Hesse-Wortmann C. (1970) Effect of weight and cell size on hormone-induced lipolysis in New Zealand obese mice and American obese hyperglycemic mice. *Diabetologia*, 6(3): 300-305.
- Herbert V, Lau KS, Gottlieb CH and Bleicher S. (1965) Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocr Metab*, 25: 1375–1384.
- Hidalgo M, 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: E930-E935.



- Hill JO, Peters JC, Lin D, Yakubu F, Greene H and Swift L. (1993) Lipid accumulation and body fat distribution is influenced by type of dietary fat fed to rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 17(4): 223-236.
- Hoffman BB, Chang H, Farahbakhsh ZT, Reaven GM (1981) Inhibition of lipolysis by adenosine is potentiated with age. *J Clin Invest*, 74: 1750-1755.
- Holm G, Jacobsson B, Bjorntorp P and Smith U. (1975) Effects of age and cell size on rat adipose tissue metabolism. *J Lipid Res*, 16: 461-464.
- Holland R, Hardie DG, Clegg A and Zammit VA. (1985) Evidence that glucagons-mediated inhibition of acetyl-CoA carboxylase in isolated adipocytes involves increased phosphorylation of the by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem J*, 226: 139-145.
- Horowitz J. (2003) Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14: 386-392.
- Horton JD, Goldstein JL and Brown MS. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109: 1125-1131.
- Hotamisligil GS, Shargill NS and Spiegelman BM. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role of obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259:87-91.
- Hotta K, Funahashi N, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC and Matsuzawa Y. (2001) Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*, 50: 1126-1133.



- Hu E, Liang P and Spiegelman BM. (1996) AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*, 271: 10697-10703.
- Huang YJ, Fang VS, Juan CC, Chou YC, Kwok CF and Ho LT. (1997) Amelioration of insulin resistance and hypertension in a fructose-fed rat model with fish oil supplementation. *Metabolism*, 46: 1252–1258.
- Hwang D. (2000) Fatty acids and immune responses - a new perspective in searching for clues to mechanism. *Annu Rev Nutr*, 20: 431-456.
- Igal RA, Wang S, Gonzalez-Baró M and Coleman RA. (2001) Mitochondrial Glycerol Phosphate Acyltransferase Directs the Incorporation of Exogenous Fatty Acids into Triacylglycerol. *Journal of Biological Chemistry*, 276:42205-42212.
- Jump DB. (2002) Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol*, 13(2): 155-64.
- Jump DB and Clarke SD. (1999) Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr*, 19: 63-90.
- Kabir M, Catalano KJ, Ananthnarayan S, Kim SP, Van Citters GW, Dea MK and Bergman RN. (2005) Molecular evidence supporting the portal theory: a causative link between visceral adiposity and hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288: E454 - E461.
- Kanarek RB and Orthen-Gambill N. (1982) Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J Nutr*, 112(8): 1546-1554.
- Kawada T. (1998) Lipid metabolism related nuclear receptor--the structure, function, expression and classification of peroxisome proliferation-activated receptor (PPAR). *Nippon Rinsho*, 56(7): 1722-1728.



- Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M and Natori T. (1992) Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*, 41: 1422-1428.
- Kajita K, Ishizuka T, Mune T, Miura A, Ishizawa M, Kanoh Y, Kawai Y, Natsume Y and Yasuda K. (2003) Dehydroepiandrosterone Down-Regulates the Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor in Adipocytes. *Endocrinology*, 144: 253 - 259.
- Kinsella JE, Lokesh B, and Stone R A. (1990) Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease. Possible mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 52: 1-28.
- Klimes I, Sebökova E, Vrana A and Kazdova L. (1993) Raised dietary intake of n-3 polyunsaturated fatty acids in high sucrose-induced insulin resistance. En: *Dietary lipids and insulin action. Second International Smolenice Insulin Symposium*. Klimes I, Howard BV, Storlien LH, Sebökova E (eds) *Annals of The New York Academy of Sciences*, New York, NY, USA, 683: 69-81.
- Knutson VP. (2000) The Release of Lipoprotein Lipase from 3T3-L1 Adipocytes Is Regulated by Microvessel Endothelial Cells in an Insulin-Dependent Manner. *Endocrinology*, 141: 693-701.
- Koyama M, Wada R, Sakuraba H, Mizukami H and Yagihashi S. (1998) Accelerated Loss of Islet  $\beta$  cells in Sucrose-Fed Goto-Kakizaki rats, a genetic model of NIDDM. *Am Journal of Pathology*, 153: 537-545.
- Kraegen EW, James DE, Storlien LH, Burleigh KM and Chisholm DJ. (1986) In vivo insulin resistance in individual peripheral tissue of the high fat fed rat: Assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration. *Diabetologia*, 29: 192-198.



- Kraegen EW and Cooney GJ. (1999) The role of 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.
- Kris-Etherton PM, Harris WS and Appel LJ. (2002) Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, 106: 2747-2757.
- Lacasa D, Agli B and Giudicelli Y. (1983) Effects of experimental insulin-dependent diabetes on the  $\beta$ -adrenergic-receptor-coupled adenylate-cyclase system and lipolysis in fat cells of the rat. *Eur. J. Biochem*, 130: 457-464.
- Lacy PE and Kostianovsky M (1967) Method for the isolation of intact islet of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16: 35-39.
- Lafontan M and Berlan M. (1995) Fat Cells  $\alpha$ 2-Adrenoceptores: The Regulation of Fat Cell Function and Lipólisis. *Endocrine Reviews*, 16: 716-738.
- Langin D, Holm C and Lafontan M. (1996) Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 55: 93-109.
- Laube H, Klör H, Fussgänger R and Pfeiffer EF. (1973) The effect of starch, glucose and fructose on lipid metabolism in rats. *Nutr Metabol*, 15: 273-280.
- Laurell S. (1966) A method for routine determination of plasma triglycerides. *Scand J Clin Lab Invest*, 18: 668–672.
- Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS and Lechan RM. (1997) Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the



hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 138: 2569-2576.

- Löhr GW and Waller HD. (1963) In: *Methods of enzymatic analysis*, edited by H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie. Academic Press. New York and London. pp: 744-751.
- Lombardo YB, Chicco A, Mocchiutti N, de Rodi MA, Nusimovich B and Gutman R. (1983) Effects of sucrose diet on insulin secretion in vivo and in vitro, and triglyceride storage and mobilisation of hearts of rats. *Horm Metab Res*, 15: 69-76.
- Lombardo YB, Drago S, Chicco A, Fainstein-Day P, Gutman R, Gagliardino JJ and Gomez-Dumm CL. (1996a) Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. *Metabolism*, 45: 1527-1532.
- Lombardo YB, Chicco A, D'Alessandro ME, Martinelli M, Soria A and Gutman R. (1996b) Dietary fish oil normalizes dyslipemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet. *Biochim Biophys Acta*, 1299: 175–182.
- Londos C, Honnor RC, Dhillon GS and Johnson DL (1985) Lipolysis and cyclic-AMP dependent protein kinase in adipocytes: adenylate cyclase regulators versus insulin. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation. Res*, 19: 221-234.
- Lopez-Soriano EJ, Carbo N and Argiles JM. (1991) Lipid metabolism in the obese Zucker rat. Disposal of an oral [14C] triolein load and lipoprotein lipase activity. *Biochem J*, 274: 651-656.



- Lowry OH, Rosebrough MJ, Farr AL and Randall RL. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- Luiken JJ, Bonen A and Glatz JF. (2002) Cellular fatty acid uptake is acutely regulated by membrane-associated fatty acid-binding proteins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 67(2-3): 73-78.
- Luo J, Rizkalla SW, Boillot J, Alamowitch C, Chaib H, Bruzzo F, Desplanque N, Dalix AM, Durand G and Slama G. (1996) Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids improve adipocyte insulin action and glucose metabolism in insulin-resistant rats: relation to membrane fatty acids. *Nutr*, 126(8): 1951-1958.
- Luo J, Rizkalla SW, Alamowitch C, Boillot J, Bruzzo F, Chevalier A and Slama G (1992) Neither dietary fructose, dextrose nor starch modifies in vitro glycerol release by adipocytes from streptozotocin-diabetic rats. *J Nutr* 122: 2361-2366.
- MacDouglas OA and Lane MD. (1995) Transcriptional regulation of gene expression during adipose differentiation. *Ann Rev Biochem*, 64: 345-367.
- Majerus PW and Kilburn E. (1969) Acetyl coenzyme A carboxylase. The roles of synthesis and degradation in regulation of enzyme levels in rat liver. *J Biol Chem*, 244: 6254-6262.
- Man ZW, Zhu M, Noma Y, Toide K, Sato T, Asahi Y, Hirashima T, Mori S, Kawano K, Mizuno A, Sano T and Shima K. (1997) Impaired beta-cell function and deposition of fat droplets in the pancreas as a consequence of hypertriglyceridemia in OLETF rat, a model of spontaneous NIDDM. *Diabetes*, 46: 1718-1724.



- Mandarino LJ. (1989) Regulation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase and glycogen synthase in man. *Diabetes Metab Rev*, 5(6): 475-486.
- 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.
- Meier U and Gressner AM. (2004) Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of Pathobiochemical and Clinical Chemical Aspects of Leptin, Ghrelin, Adiponectin, and Resistin. *Clin Chem*, 50: 1511-1525.
- Memon RA, Fuller J, Moser AH, Smith PJ, Grunfeld C and Feingold KR. (1999) Regulation of putative fatty acid transporters and Acyl-CoA synthetase in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Diabetes*, 48: 121-127.
- Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G and Vettor R. (2002) Resistin and Adiponectin Expression in Visceral Fat of Obese Rats: Effect of Weight Loss. *Obesity Research*, 10: 1095-1103.
- Miles PD, Romeo OM, Higo K, Cohen A, Rafaat K and Olefsky JM. (1997) TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes*, 46: 1678-1683.
- Minehira K, Bettschart V, Vidal H, Vega N, Di Vetta V, Rey V, Schneiter P and Tappy L. (2003) Effect of Carbohydrate Overfeeding on Whole Body and Adipose Tissue Metabolism in Humans. *Obes Res*, 11: 1096-1103.





- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D and Kahn BB. (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, 415 (6869): 339-343.
- Miyazaki A and Watanabe T. (2004) Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT). *Nippon Rinsho*, 62 (Suppl 12): 89-91.
- Montes M, Chicco A and Lombardo YB. (2000) The effect of insulin on the uptake and metabolic fate of glucose in isolated perfused hearts of dyslipemic rats. *J Nutr Biochem*, 11: 30-37.
- Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, O'Neal DN and Best JD. (2000) Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am J Clin Nutr*, 71: 1085-1094.
- Morimoto C, Tsujita T and Okuda H. (1998) Antilipolytic actions of insulin on basal and hormone-induced lipolysis in rat adipocytes. *J Lipid Res*, 38: 957-962.
- Morimoto C, Kameda K, Tsujita T and Okuda H. (2001) Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. *J Lipid Res*, 42: 120-127.
- Morrison SF. (2004) Central Pathways Controlling Brown Adipose Tissue Thermogenesis. *News Physiol Sci*, 19: 67-74.
- Moustaid N and Sul HS. (1991) Regulation of expression of the fatty acid synthase gene in 3T3-L1 cells by differentiation and triiodothyronine. *J Biol Chem*, 266: 18550-18554.
- Mueller WM, Gregoire FM, Stanhope KL, Mobbs CV, Mizuno TM, Warden CH, Stern JS and Havel PJ. (1998) Evidence That Glucose



Metabolism Regulates Leptin Secretion from Cultured Rat Adipocytes. *Endocrinology*, 139: 551-558.

- Nadler ST, Stoehr JP, Schueler KL, Tanimoto G, Yandell BS and Attie AD. (2000) The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *PNAS*, 97: 11371-11376.
- Naggert J, Fricker L, Varlamov O, Nishina P, Rouille Y, Steiner D, Carrol R, Paigen B and Leiter E. (1995) Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet*, 10:135-142.
- Nakanishi S and Numa S. (1970) Purification of rat liver acetyl-CoA carboxylase and immunochemical studies on its synthesis and degradation. *Eur J Biochem*, 16: 161-173.
- Nawano M, Oku A, Ueta K, Umebayashi I, Ishirahara T, Arakawa K, Saito A, Anai M, Kikuchi M and Asano T. (2000) Hyperglycemia contributes insulin resistance in hepatic and adipose tissue but not skeletal muscle of ZDF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278: E535-E543.
- Neschen S, Moore I, Regittnig W, Yu C, Wang Y, Pypaert M, Petersen K and Shulman G. (2002) Contrasting effects of fish oil and safflower oil on hepatic peroxisomal and tissue lipid content. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282: 395-401.
- Newby FD, Di Girolamo M, Cotsonis GA and Kutner MH. (1990) Model of spontaneous obesity in aging male Wistar rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 259: R1117–R1125.
- Nyholm B, Fisker S, Lund S, Moller N and Schmitz O. (1997) Increased circulating leptin concentrations in insulin-resistant first-degree relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus:



relationship to body composition and insulin sensitivity but not to family history of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*, 136: 173-179.

- Oakes ND, Bell KS, Furler SM, Camilleri S, Saha AK and Ruderman NB. (1997) Diet-induced muscle insulin resistance in rats is ameliorated by acute dietary lipid withdrawal or a single bout of exercise: parallel relationship between insulin stimulation of glucose uptake and suppression of long-chain fatty acyl-CoA. *Diabetes*, 46: 2022-2028.
- Oh W, Abu-Elheiga L, Kordari P, Gu Z, Shaikenov T, Chirala SS and Wakil SJ. (2005) Glucose and fat metabolism in adipose tissue of acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice. *PNAS*, 102: 1384 - 1389.
- Ohinata H, Saha SK, Ohno T, Hata N, Misawa Y and Kuroshima A. (1998) Effect of dietary docosahexaenoic acid on in vitro thermogenesis and fatty acid compositions of brown adipose tissue. *Jpn J Physiol*, 48(3): 189-196.
- Okuno M, Kajiwara K, Imai S, Kobayashi T, Honma N, Maki T, Suruga K, Goda T, Takase S, Muto Y, and Moriwaki H. (1997) Perilla Oil Prevents the Excessive Growth of Visceral Adipose Tissue in Rats by Down-Regulating Adipocyte Differentiation. *J Nutr*, 127: 1752-
- Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y and Kadowaki T. (1998) Troglitazone Increases the Number of Small Adipocytes without the Change of White Adipose Tissue Mass in Obese Zucker Rats. *J Clin Invest*, 101: 1354-1361.
- Olefsky JM (1978) Mechanisms of ability of insulin to activate the glucose-transport system in rat adipocytes. *Biochem, J* 172: 137-145.



- Olivecrona G and Beisiegel U. (1997) Lipid Binding of Apolipoprotein CII Is Required for Stimulation of Lipoprotein Lipase Activity Against Apolipoprotein CII-Deficient Chylomicrons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 1545 – 1549.
- Östman J, Backman L and Hallberg D. (1973) Cell size and lipolysis by human subcutaneous adipose tissue. *Acta Med Scand*, 193(5): 469-475.
- Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA and Pan DA (1996) Changes in insulin action, triglycerides and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am J Physiol*, 271: 1319-1326.
- Pagliassotti M.J, 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: 170-176.
- Park J, Rho HK, Kim HK, Choe SS, Lee YS and Kim JB. (2005) Overexpression of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Is Associated with Lipid Dysregulation and Insulin Resistance in Obesity. *Mol Cell Biol*, 25: 5146 - 5157.
- Parrish CC, Pathy DA, Parkes JG and Angel A. (1991) Dietary fish oils modify adipocyte structure and function. *J Cell Physiol*, 148: 493-502.
- Pedersen O, Kahn CR, Flier JS and Kahn BB. (1991) High fat feeding causes insulin resistance and a marked decrease in the expression of glucose transporters (Glut 4) in fat cells of rats. *Endocrinology*, 129: 771 -777.
- Peraldi P, Xu M and Spiegelman B. (1997) Thiazolidinediones Block Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Inhibition of Insulin Signaling. *J Clin Invest*, 100: 1863-1869.



- Peterson RG, Shaw WN, Neel MA, Little LA and Eichberg J. (1990) Zucker diabetic fatty rat as model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *ILAR news*, 32: 16-19.
- Peyron-Caso E, Fluteau-Nadler S, Kabir M, Guerre-Millo M, Quignard-Boulangé A, Slama G and Rizkalla SW. (2002a) Regulation of glucose transport and transporter 4 (GLUT-4) in muscle and adipocytes of sucrose-fed rats: effects of N-3 poly- and monounsaturated fatty acids. *Horm Metab Res*, 34(7): 360-366.
- Peyron-Caso E, Taverna M, Guerre-Millo M, Véronèse A, Pacher N, Slama G and Rizkalla SW. (2002b) Dietary (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids Up-Regulate Plasma Leptin in Insulin-Resistant Rats. *J Nutr*, 132: 2235-2240.
- Phillips MS, Liu Q, Hammond A, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ and Hess JF. (1996) Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* 13: 18-19.
- Pighín 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.
- Pittas AG, Joseph NA and Greenberg AS. (2004) Adipocytokines and Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 447-452.
- Podolin DA, Gayles EC, Wei Y, Thresher JS and Pagliassotti MJ. (1998) Menhaden oil prevents but does not reverse sucrose-induced insulin resistance in rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 274: 840-848.



- Portha B, Picon L and Rosselin G. (1979) Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetología*, 17: 371-377.
- Prentki M, Joly E, El-Assaad W and Roduit R. (2002) Malonyl-CoA Signaling, Lipid Partitioning, and Glucolipotoxicity: Role in  $\beta$ -Cell Adaptation and Failure in the Etiology of Diabetes. *Diabetes*, 51: 405-413.
- Raclot T and Groscolas R. (1993) Differential mobilization of white adipose tissue fatty acids according to chain length, unsaturation, and positional isomerism. *J Lipid Res*, 34: 1515-1526.
- Raclot T, Groscolas R, Langin D and Ferre P. (1997) Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissue. *J Lipid Res*, 38: 1963-1972.
- Raclot T and Oudart H. (2000) Net release of individual fatty acids from white adipose tissue during lipolysis in vitro: evidence for selective fatty acid re-uptake. *Biochem J*, 348: 129-136.
- Randle PJ. (1998) Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev*, 14(4): 263-283.
- Reynolds MV, Awald PD, Gordon DF, Gutierrez-Hartmann A, Rule DC, Wood WM and Eckel RH. (1990) Lipoprotein lipase gene expression in rat adipocyte is regulated by isoproterenol and insulin through different mechanisms. *Mol Endocrinol*, 4: 1416-1422.
- Reaven GM, Risser TR, Chen Y-D and Reaven E. (1979) Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, non obese rats. *J Lipid Res*, 20: 371-378.



- Reaven GM. (1984) Diabetic hipertrigliceridemia in the rat: animal models simulating the clinical syndromes of impaired glucose tolerance, noninsulin-dependent diabetes and insulin-dependent diabetes. En: Shafrir E, Renold AS, editors. Lessons from animal diabetes. London (UK): Libby; pp. 531-536.
- Reaven GM, Chang H, Hoffman BB. (1989) Impaired insulin mediated inhibition of lipolysis and glucose transport with aging. *Horm Metab Res*, 21: 168-171.
- Reaven GM. (2000) Diet and Syndrome X. *Curr Atheroscler Rep*, 2: 503-507.
- Reidy SP and Weber JM. (2002) Accelerated substrate cycling: a new energy-wasting role for leptin in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282: 312-317.
- Reseland JE, Haugen F, Hollung K, Solvoll K, Halvorsen B, Brude IR, Nenseter MS, Christiansen EN and Drevon CA. (2001) Reduction of leptin gene expression by dietary polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*, 42: 743-750.
- Rizkalla SW, Helal I, Boillot J, Fontvieille AM, Laromiguiere M, Desplanque N, Bruzzo F, Tchobroutsky G and Slama G. (1990) Comparative metabolic effects of 10 week of starch, glucose, fructose in normal rats. En: *Insulin and the Cell Membrane*, edited by Klimes I, Howard BV, and Kohn CR. New York: Gordon & Breach, 1: 432-450.
- Rizkalla SW, Alamowitch C, Luo J, Bruzzo F, Boillot J, Chevalier A and Slama G. (1993) Effect of dietary fish oil on insulin action in fat cells of control and non-insulin-dependent rats. En: I. Klimes, B.V. Howard, L.H. Storlien and E. Sebokova, Editors, *Dietary Lipids and Insulin Action* vol. 683, Annals of The New York Academy of Sciences, New York, NY, USA, pp. 213-217.



- Rodbell M. (1964) Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem*, 239: 375–380.
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM and Mortensen RM. (1999) PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*, 4: 611-617.
- Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, Heymsfield SB, Gallagher D, Chu F and Leibel RL. (1996) Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 3424 - 3427.
- Rossi AS, Lombardo YB, Lacorte JM, Chicco AG, Rouault C, Slama G and Rizkalla SW. (2005) Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 289: R486 - R494.
- Rousseau V, Becker DJ, Ongemba LN, Rahier J, Henquin JC and Brichard SM. (1997) Developmental and nutritional changes of ob and PPAR gamma 2 gene expression in rat white adipose tissue. *Biochem J*, 321 (Pt 2): 451-456.
- Rustan AC, Hustvedt B and Drevon CA. (1998) Postprandial decrease in plasma unesterified fatty acids during n-3 fatty acid feeding is not caused by accumulation of fatty acids in adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*, 1390: 245–257.
- Salans LB, Knittle JL and Hirsch J. (1968) The role of adipose cell size and adipose tissue insulin in the carbohydrate intolerance of human obesity. *J Clin Invest*, 47: 153-165.





- Saleh M, Wheeler M and Chan C. (2002) UCP2: evidence for its function as a metabolic regulator. *Diabetología*, 45:174-187.
- Sandra A, Fyler DJ and Marshall SJ. (1984) Effects of lipids on the transport activity of the reconstituted glucose transport system from rat adipocyte. *Biochim Biophys Acta*, 778(3): 511-515.
- Scarpace PJ, Matheny M, Pollock BH and Tumer N. (1997) Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 273: 226-230.
- Schemmel R, Taegue R and Bray G. (1982) Obesity in Osborne-Mendel and S 5B/PI rats: Effects of sucrose solutions, castration, and treatment with estradiol or insulin. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 243: R347-R352.
- Scherer PE. (2003) The role of adiponectine in carbohydrate and lipid metabolism. *Endocrine Abstract*, 5: S20.
- 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 and Kraegen EW. (1997) Alteration in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes  $\epsilon$  and  $\theta$  are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat. *Diabetes*, 46: 169-178.
- Schonfeld G and Pflieger B. (1971) Utilization of exogenous free fatty acids for the production of very low density lipoprotein triglyceride by livers of carbohydrate-fed rats. *J Lipid Res*, 12: 614-621.
- Schwake U, Ebert R and Erbler HC. (1975) *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 5: 569-584.



- Semenkovich CF, Wims M, Noe L, Etienne J and Chan L. (1989) Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at post-transcriptional and post-translational levels. *J Biol Chem*, 264: 9030-9038.
- Sevilla L, Guma A, Enrique-Tarancon G, Mora S, Muñoz P and Palacin M. (1997) Chronic high-fat feeding and middle-aging reduce in an additive fashion Glut 4 expression in skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 235:89-93.
- Shafrir E and Trostler N. (1984) Sucrose diet induced enzymatic and hormonal responses affecting carbohydrate, lipid and energy metabolism in two species differing in insulin availability: spiny and ob/ob mice. *Int J Biochem*, 16(4): 375-382.
- Shafrir E. (1985) Effect of sucrose and fructose on carbohydrate and lipid metabolism and the resulting consequences. Regulation of carbohydrate metabolism. Cap V, Vol II, R Beitner Editor, CRC Press. Inc, USA, pp 95-140.
- Shaughnessy S, Smith ER, Kodukula S, Storch J and Fried SK. (2000) Adipocyte metabolism in adipocyte fatty acid binding protein knockout mice (aP2-/-) after short-term high-fat feeding: functional compensation by the keratinocyte [correction of keratinocyte] fatty acid binding protein. *Diabetes*, 49: 904-911.
- Shepherd PR and Kahn BB. (1999) Glucose Transporters and Insulin Action — Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*, 341: 248-257.
- Shintani M, Nishimura H, Yonemitsu S, Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y and Nakao K. (2000) Downregulation of leptin by free fatty acids in rat adipocytes: effects of triacsin C, palmitate, and 2-bromopalmitate. *Metabolism*, 49(3): 326-30.



- Shrago E and Spennetta T. (1976) The carbon pathway for lipogenesis in isolated adipocytes from rat, guinea pig, and human adipose tissue. *Am J Clinical Nutrition*, 29: 540-545.
- Simopoulos AP, Leaf A and Salem N Jr. (1999) Workshop on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids. *J Am Coll Nutr*, 18: 487-489.
- Sinnott-Smith PA and Waddington D. (1992) Size distribution of adipocytes and variation in adipocyte number in lines of mice selected for high or low body fat. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*, 102(3): 573-578.
- Sivitz WI, Walsh SA, Morgan DA, Thomas MJ and Haynes WG. (1997) Effects of Leptin on Insulin Sensitivity in Normal Rats. *Endocrinology*, 138: 3395-3401.
- Sleeman MW, Donegan NP, Heller-Harrison R, Lane WS and Czech MP. (1998) Association of Acyl-CoA Synthetase-1 with GLUT4-containing Vesicles. (1998) *J Biol Chem*, 273: 3132-3135.
- Smith U. (1971) Effect of cell size on lipid synthesis by human adipose tissue in vitro. *J Lipid Res*, 12: 65-70.
- Smith U, Kral J and Bjorntorp P. (1974) Influence of dietary fat and carbohydrate on the metabolism of adipocytes of different size in the rat. *Biochim Biophys Acta*, 337: 278-285.
- Snedecor GW and Cochran WG. (1967) *Statistical methods applied to experimental in agriculture and biology*. Iowa State University Press, Ames, IA, USA.
- Sonnenberg G, Krakower G and Kissebah A. (2004) A Novel Pathway to the Manifestations of Metabolic Syndrome. *Obesity research*, 12: 180-186.



- 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 Apply Physiology*, 91:2109-2116.
- Spector AA and Yorek MA. (1985) Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res*, 26: 1015-1035.
- Spiegelman BM. (1998) PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, 47: 507-514.
- Steinberg GR, Bonen A and Dyck DJ. (2002) Fatty acid oxidation and triacylglycerol hydrolysis are enhanced after chronic leptin treatment in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282: 593 -600.
- Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS and Lazar MA. (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409: 307-312.
- Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ and Kraegen EW. (1986) Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure and obesity in rats. *Am L Physiol*, 251: 576-583.
- Storlien LH, Kraegen EW, Chisholm DJ, Ford GL, Bruce DG and Pascoe WS. (1987) Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science*, 237(4817): 885-888.
- Storlien LH, Kraegen EW, Jenkins AB and Chisholm DJ. (1988) Effects of sucrose vs starch diets on in vivo insulin action, thermogenesis and obesity in rats. *Am J Clin Nutr*, 47: 420-427.
- Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S and Kraegen EW. (1991) Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats: relationship to muscle



triglyceride and n-3 fatty acids in muscle phospholipids. *Diabetes*, 40: 280–289.

- Storlien LH, Oakes ND, Pan DA, Kusunoki M and Jenkins AB. (1993a) Syndromes of insulin resistance in the rat. Inducement by diet and amelioration with benfluorex. *Diabetes*, 42: 457-462.
- Storlien LH, Pan DA, Kusunoki M and Cooney G.J. (1993b) Effects of benfluorex on in vivo patterns of insulin resistance induced by diets rich in fat or fructose. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 9: 65-72.
- Storlien LH, Pan DA, Kriketos AD, O'Connor J, Caterson ID and Cooney GJ. (1996) Skeletal muscle membrane lipids and insulin resistance. *Lipids*, 31: 261-265.
- Storlien LH, Hulbert AJ and Else PL. (1998) Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 1(6): 559-563.
- Suzuki H, Goshi H and Sugisawa H. (1975) Effects of previous feeding of a carbohydrate or a high fat diet on changes in body weight and body composition of fasted rats. *J Nutr*, 105: 90-95.
- Takahashi Y and Ide T. (2000) Dietary n-3 fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. *Br J Nutr*, 84(2): 175-184.
- Taouis M, Dagou C, Ster C, Durand G, Pinault M and Delarue J. (2002) N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. *Am J Physiol*, 282: 664-671.
- Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AB, Khouri S and Kraegen EW. (1989) Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated



plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clinical Nutrition*, 49: 1155-1163.

- Tontonoz P, Hu E and Spiegelman BM. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR  $\gamma$ 2 a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79: 1147-1156.
- Torres N, Torre-Villalvazo I and Tovar AR. (2006) Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J Nutr Biochem*, 17(6): 365-373.
- Tsujita T, Morimoto C and Okuda H. (1995) Mechanism of increase in basal lipolysis of enlarged adipocytes in obese animals. *Obes Res*, 3: 633S-636S.
- Tuncman G, Erbay E, Hom X, De Vivo I, Campos H, Rimm EB and Hotamisligil GS. (2006) A genetic variant at the fatty acid-binding protein *aP2* locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *PNAS*, 103: 6970-6975.
- Unger RH. (1997) How obesity causes diabetes in Zucker diabetic fatty rats? *Trends Endocrinol Metab*, 8: 276-282.
- Unger RH and Zhou Y. (2001) Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes*, 50: 118-121.
- Volpe JJ and Marasa JC. (1975) Hormonal regulation of fatty acid synthetase, acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthesis in mammalian adipose tissue and liver. *Biochem Biophys Acta*, 380: 454-472.
- Volpe JJ and Vagelos PR. (1976) Mechanisms and regulation of biosynthesis of saturated fatty acids. *Physiol Rev*, 56: 339-417.



- Vrána A and Fabry P. (1973) Dietary carbohydrates and adipose tissue metabolism. *Prog. Biochem Pharmacol*, vol 8, pp 189-125.
- Vrána A and Kazdova L. (1986) Effects of dietary sucrose or fructose on carbohydrate and lipid metabolism. *Prog Biochem Pharmacol*, 21: 59–73.
- Vrána A, Zak A and Kazdova L. (1988) Inhibition of sucrose induced hypertriglyceridemia and increase of the adipose tissue insulin response by dietary n-3 fatty acids in the rat. *Nutr Rep Int*, 38: 687–690.
- Vrána A, Kazdova L, Dobesova Z, Kunes I, Kren V, Bila V, Stolba P, Klimes I. (1993) Triglyceridemia, glucoregulation and blood pressure in various rats strains. Dietary lipids and insulin action. Second International Smolenice Insulin Symposium. *Annals of the New York Academy of Sciences* vol 683, pp 57-68.
- Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, Christoffersen CT, Englaro P, Heinze E, Rascher W, Teller W, Tornqvist H and Hauner H. (1996) Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes*, 45: 1435-1438.
- Walczak R and Tontonoz P. (2002) PPARadigms y PPARadoxes: expanding roles for PPARy in the control of lipid metabolism. *Journal of Lipid Research*, 43: 177-186.
- Wajchenberg BL. (2000) Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocr Rev*, 21: 697-738.
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE and Tataranni PA. (2001) Hypoadiponectinemia in Obesity and Type 2 Diabetes: Close Association with Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 1930-1935.



- Willson TM, Lambert MH and Kliewer SA. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu Rev Biochem*, 70: 341-67.
- Wise E and Ball EG. (1964) Malic Enzyme and Lipogenesis. *Proc Nat Acad Science*, 52: 1255-1263.
- Witters LA, Watts TD, Daniels DL and Evans JL. (1988) Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase. *Proc Nat Acad Sci USA*, 85: 5473-5477.
- Wollenberger A, Ristau O and Schofa G. (1960) Eine einfache technick der extrem schnellen abkuhlung grober gewebsstucke. *Pflugers Arch Ges Physiol*, 270: 399-412.
- Xu J, Nakamura M, Cho H, Clarke S. (1999) Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 Expression Is Suppressed by Dietary Polyunsaturated Fatty Acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(33): 23577-23583.
- Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, Wat NMS, Wong WK and Lam KSL. (2006) Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Is a Plasma Biomarker Closely Associated with Obesity and Metabolic Syndrome. *Clin Chem*, 52: 405-413.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Ide T, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Miki H, Tsuchida A, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S and Kadowaki T. (2001) The Mechanisms by Which Both Heterozygous Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Deficiency and PPAR $\gamma$  Agonist Improve Insulin Resistance. *J Biol Chem*, 276: 41245-41254.
- Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY and Chuang LM. (2001) Weight Reduction Increases





Plasma Levels of an Adipose-Derived Anti-Inflammatory Protein, Adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 3815-3819.

- Yeaman S. (1990) Hormone-sensitive lipase - A multipurpose enzyme in lipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1052: 128-132.
- Young JB (1988) Effect of experimental hyperinsulinemia on sympathetic nervous system activity in the rat. *Life Sci*, 43(2): 193-200.
- Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M and Olefsky JM. (2002) The Effect of Thiazolidinediones on Plasma Adiponectin Levels in Normal, Obese, and Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes*, 51: 2968-2974.
- 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.
- Zhou YT, Shimabukuro M, Koyama K, Lee Y, Wang MY, Trieu F, Newgard CB and Unger RH (1997) Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *PNAS*, 94: 6386-6390.
- Zimmet P, Alberti KGMM and Shaw J. (2001) Global and societal implications of diabetes epidemia. *Nature*, 414: 782-787.
- Zucker L and Antoniades H. (1972) Insulin and obesity in Zucker genetically obese rat “Fatty”. *Endocrinology*, 90: 1320-1330.