

## Comunicación breve

# Comportamiento de enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD) en el músculo cardíaco de ratas dislipémicas insulino resistentes. Estudio preliminar

RECIBIDO: 30/08/2017

REVISIÓN: 28/09/2017

ACEPTADO: 10/10/2017

**Oliva, M.E. • Creus, A. • Lombardo, Y.B. • Chicco, A.G.**

Departamento de Ciencias Biológicas. Cátedra de Química Biológica. Laboratorio de Estudio de Enfermedades Metabólicas relacionadas con la nutrición. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo S/N. S3000ZAA, CC 242, Santa Fe, Argentina.

Teléfono: 54-342-4575211. e-mail: meoliva@fbc.unl.edu.ar

**RESUMEN:** El objetivo del trabajo fue analizar en músculo cardíaco el efecto de la administración crónica de dieta rica en sacarosa (DRS) sobre el comportamiento de algunas enzimas antioxidantes y a nivel plasmático la peroxidación lipídica y grupos carbonilos en proteínas como marcadores de daño oxidativo, algunas citoquinas inflamatorias y la presión arterial. Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso inicial de 180 g. Luego de una semana de aclimatación los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos. El grupo control recibió una dieta semisintética (% en peso: almidón: 62,5, aceite de maíz: 7 y proteínas: 18). El grupo DRS recibió la misma dieta semisintética donde la sacarosa sustituyó al almidón como fuente de hidratos de carbono. Los animales de ambos grupos fueron alimentados por 32 semanas. Los resultados alcanzados demuestran que los animales alimentados con DRS presentan: **a-** disminución de las

actividades enzimáticas glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD);

**b-** aumento significativo de los niveles plasmáticos de las citoquinas inflamatorias IL-6 y TNF $\alpha$ ; **c-** incremento en la peroxidación lipídica y en los grupos carbonilos en proteínas. Estos efectos se acompañaron de dislipemia, moderada hiperglucemia, adiposidad visceral e hipertensión.

**PALABRAS CLAVES:** dieta rica en sacarosa, estrés oxidativo, inflamación, músculo cardíaco.

**SUMMARY:** Behavior of antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) in the cardiac muscle of insulin resistant dyslipemic rats. Preliminary study.

The objective of the study was to analyze the effect of chronic sucrose-rich diet

(SRD) in cardiac muscle on the behavior of some antioxidant enzymes as well as the plasma levels of lipid peroxidation and protein carbonyl groups as markers of oxidative damage, some inflammatory cytokines and blood pressure. Wistar male rats with an initial weight of 180 g were used. After one week of acclimatization the animals were randomly divided into two groups. The control group received a semisynthetic diet (weight % starch: 62.5, corn oil: 7 and proteins: 18). The SRD group received the same semisynthetic diet where sucrose replaced starch as source of carbohydrates. Animals from both groups

were fed for 32 weeks. The results show that the animals fed with DRS present: **a-** decreased enzymatic activities glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD); **b-** significant increase of plasma IL-6 and TNF $\alpha$  inflammatory mediators; **c-** increase in lipid peroxidation and protein carbonyl groups. These effects were accompanied by dyslipidemia, moderate hyperglycemia, visceral adiposity and hypertension.

**KEYWORDS:** sucrose rich diet, oxidative stress, inflammation, heart muscle.

---

## Introducción

El estrés oxidativo juega un rol importante en la patogénesis de la disfunción endotelial, hipertensión, inflamación, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, entre otras, principales componentes del síndrome metabólico (MS) (1,2). El estrés oxidativo puede resultar de un exceso de producción de radicales libres y/o una deficiencia de la capacidad antioxidante en diferentes tejidos como el músculo cardíaco, hígado y riñón. Las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx) representan importantes componentes del sistema de defensas antioxidantes. Consecuentemente, deficiencias en una o más de estas enzimas contribuye al desarrollo de estrés oxidativo (3).

El estrés oxidativo está altamente correlacionado con el daño causado por el acumulo de radicales libres. Se ha demostrado que los radicales libres pueden afectar negativamente a la supervivencia celular debido a un daño en la membrana a través del daño oxidativo de los lípidos, las proteínas y la modi-

ficación irreversible del ADN. La peroxidación de lípidos, tales como las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y los niveles de hidroperóxidos, así como los marcadores de la oxidación de proteínas como los grupos carbonilo son marcadores de daño oxidativo (4).

Diferentes estudios sugieren que la administración de una dieta con alto contenido de fructosa tiene un efecto pro-oxidante en ratas y que el efecto perjudicial de una dieta con alto contenido en sacarosa puede atribuirse a su contenido en fructosa (5–7).

Experimentalmente, nuestro grupo y otros han demostrado que las ratas alimentadas crónicamente con una dieta rica en sacarosa/fructosa desarrollan alteraciones metabólicas y fisiológicas mimetizando varios aspectos del síndrome metabólico en los seres humanos (8–10).

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que ratas normales alimentadas crónicamente con dietas ricas en sacarosa (DRS) desarrollan dislipemia, homeos-

tasis alterada de la glucosa, resistencia insulínica, adiposidad visceral y lipotoxicidad (acumulación de lípidos en tejidos no adiposos como hígado, músculo esquelético, páncreas) (10–12). El músculo cardíaco no es ajeno a estos cambios. La dislipidemia e hiperglucemia desarrollada en estos animales tienen profundos efectos en la utilización de los sustratos energéticos por el miocardio. Hemos constatado previamente un incremento en el contenido de triglicéridos, acilCoA de cadena larga y diacilglicerol, acompañado de una disminución en la oxidación y alterada captación de la glucosa bajo el estímulo de la insulina en ratas alimentadas crónicamente con DRS (13,14). En relación al estrés oxidativo hemos observado una depleción de las actividades de las enzimas antioxidantes y un incremento de la actividad de la enzima xantino oxidasa y peroxidación lipídica en tejido adiposo luego de 30 semanas de dieta.

En vista de las alteraciones observadas en el músculo cardíaco y otros tejidos antes mencionadas en este modelo experimental, el objetivo del presente trabajo fue evaluar en músculo cardíaco el efecto de la administración crónica de DRS sobre el comportamiento de algunas enzimas antioxidantes, analizando también a nivel plasmático la peroxidación lipídica, marcadores de daño oxidativo, niveles de citoquinas inflamatorias (IL-6 y TNF $\alpha$ ) y cambios en la presión arterial.

## **Materiales y métodos**

### *Animales y dietas*

Se utilizaron ratas macho Wistar provenientes del Centro de Medicina Comparada, ICIVET (UNL-CONICET), (Esperanza, Argentina), con un peso inicial de 180 g (adultos jóvenes). Los animales se mantuvieron bajo condiciones de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y

humedad controladas, con un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (7:00-19:00 h) con libre acceso al agua y a una dieta estándar comercial de laboratorio (Ralston, Purina, St. Louis, MO, USA). Luego de una semana de aclimatación los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos. El grupo control (DC) (n=24) recibió una dieta semisintética (% en peso): almidón: 62,5, aceite de maíz: 7 y proteínas: 18. El grupo DRS (n=24) recibió la misma dieta semisintética donde la sacarosa sustituyó al almidón como fuente de hidratos de carbono. Los animales de ambos grupos fueron alimentados por 32 semanas. La Tabla 1 muestra la composición de las dietas cuyos componentes se basan en las recomendaciones del Comité ad hoc del "American Institute of Nutrition" (17). Las mismas fueron preparadas semanalmente y mantenidas a  $4^\circ\text{C}$  hasta el momento del consumo. Todas proveen aproximadamente 16,30 KJ/g de comida y se administraron "ad libitum".

Durante todo el período experimental se determinó la ganancia de peso y la ingesta calórica de las ratas pertenecientes a cada grupo dietario.

### *Métodos analíticos*

Finalizado el período experimental, los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/kg peso corporal). Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena yugular, se recogieron en tubos que contenían EDTA sódico como anticoagulante y se centrifugaron rápidamente. El plasma obtenido fue utilizado inmediatamente o conservado a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento. El músculo cardíaco fue inmediatamente removido, pesado y congelado a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento.

Los niveles plasmáticos de triglicéridos (TG) y glucosa fueron cuantificados con kits analíticos comerciales disponibles (Wiener Lab., Rosario, Santa Fe, Argentina). Los ácidos grasos no esterificados (AGNE) se determinaron usando un kit colorimétrico basado en acil-CoA oxidasa (Wako NEFA-C, Wako Chemicals, Neuss, Alemania). La insulina plasmática se determinó mediante el ensayo inmunoreactivo de Herbert (18) utilizando un estándar de insulina de rata (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca). La interleuquina-6 y TNF- $\alpha$  fueron medidos

usando Kits comerciales de ELISA (Thermo Scientific, Rockford, USA).

#### *Determinación de la presión sanguínea*

En todos los grupos experimentales la medida de la presión sanguínea se realizó utilizando el equipo CODA de medición automática no invasiva tailcut off (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA). Las mediciones se realizaron a las 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 y 32 semanas desde el inicio del período experimental. Los valores obtenidos se presentan como la media  $\pm$  SEM de 8 determinaciones individuales.

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

Componentes	DC		DRS	
	% en Peso	% en KJ	% en Peso	% en KJ
Almidón	62,5	65,8	-	-
Sacarosa	-	-	62,5	65,8
Caseína	18	17,4	18	17,4
Aceita de maíz	7	16,8	7	16,8
Vitaminas <sup>2</sup>	1		1	
Fibras	7,5		7,5	
Sales <sup>3</sup>	3,5		3,5	
Colina bitartrato	0,2		0,2	
Metionina	0,3		0,3	

1. DC: Dieta control; DRS: Dieta rica en sacarosa.

2. Mezcla de vitaminas AIN-93M-MX (g/kg de dieta): Vitamina A (500.000 UI/g) 0.8; Vitamina D<sub>3</sub> (400.000 UI/kg) 2.75; Vitamina E (500 UI/g) 15.0; vitamina K 0.075; Biotina 0.020; Vitamina B<sub>12</sub> 2500; Acido Fólico 0.200; Niacina 3.0; Pantotenato de calcio 1.6; Piridoxina HCl 0.7; Riboflavina 0.6; Tiamina HCl 0.6.

3. Mezcla de sales AIN-93M-MX (g/kg de dieta): Carbonato de calcio 357.0; Fosfato monobásico de potasio 250; Cloruro de sodio 74; Sulfato de potasio 46.6; Citrato de potasio monohidratado 28.0; Oxido de magnesio 24.0; Citrato ferrico 6.06; Carbonato de zinc 1.65; Carbonato de magnesio 0.63; Carbonato cuprico 0.30; Yodato de potasio 0.01; Selenato de sodio 0.01025; Molibdato de amonio 0.00795; Cromato de potasio 0.275.

#### *Niveles plasmáticos de grupos carbonilos en proteínas y ácido tiobarbitúrico (TBARS)*

La formación de grupos carbonilos en proteínas, como marcador de daño oxidativo proteico, fue medido espectrofotométricamente como lo describió anteriormente

Ferreira y col. (16). La peroxidación lipídica en el plasma se estimó midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como lo describió anteriormente D'Alessandro y col. (15)

### *Actividades de enzimas antioxidantes en tejido cardiaco*

La actividad de la enzima GPx se determinó según el método de Paglia y Valentine (19) según se describió anteriormente (15). La actividad de la enzima SOD se determinó espectrofotométricamente según Kakkar y col. (20). El contenido de proteínas fue medido por el método de Bradford (Bio-Rad reagent).

### *Aislamiento de ARN y análisis semi-cuantitativo de RT-PCR*

Los niveles de GPx y SOD del tejido cardiaco se determinaron por RT-PCR según lo descrito anteriormente (16). La amplificación por PCR se llevó a cabo utilizando primers de oligonucleótidos específicos (Tabla 2). Las intensidades de las bandas se cuantificaron utilizando el software Image de Scion de NIH. La cuantificación del rRNA 28S se realizó para normalizar las muestras.

**Table 2.** Secuencias de los primers utilizados para amplificar diferentes genes por RT-PCR y tamaños de los fragmentos generados.

Gen	Forward (5´-3´)	Reverse (5´-3´)	Tamaño (bp)
SOD	AGCTGCACCACAGCAAGCAC	TCCACCACCCTTAGGGCTCA	191
GPx	CCACCGTGTATGCCTTCTCC	ACCGGGGACCAAAATGATGTA	424
S28	GTGAAAGCGGGCCTCACGATCC	TACTGAGCAGGATTACCATGGC	200

### *Análisis estadístico*

Los tamaños de las muestras se calcularon sobre la base de mediciones realizadas previamente con ratas alimentadas con DC o DRS (10,13,21) considerando un poder del 80% (22). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. Las comparaciones estadísticas se realizaron transversalmente entre diferentes grupos dietarios. La distribución normal de los datos se probó utilizando el test de Shapiro-Wilk. La homogeneidad de las varianzas se probó utilizando el test de Levene. La significación estadística entre dos grupos (DC y DRS) se determinó mediante la prueba t de Student. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (SPSS 15.0 para Windows, SPSS INC. Chicago, Illinois) (23).

### **Resultados**

#### *Peso corporal, ingesta calórica y parámetros plasmáticos*

Como se muestra en la Tabla 3, el peso corporal y la ingesta calórica son similares en ambos lotes al inicio de la experiencia. Al finalizar el periodo experimental el lote DRS presenta un significativo incremento en el peso corporal ( $p < 0,05$ ) y la ingesta calórica ( $p < 0,05$ ) cuando se los compara con el lote DC. Corroborando estudios previos (11,24), los niveles plasmáticos de TG, AGNE y glucosa fueron significativamente más elevados en los animales alimentados con DRS cuando se los compara con el grupo DC. No se observaron diferencias significativas en los niveles de insulina plasmática al final del periodo experimental entre los 2 grupos dietarios.

**Tabla 3.** Peso corporal, ingesta calórica y parámetros plasmáticos en ratas alimentadas con dieta control (DC) y dieta rica en sacarosa (DRS).

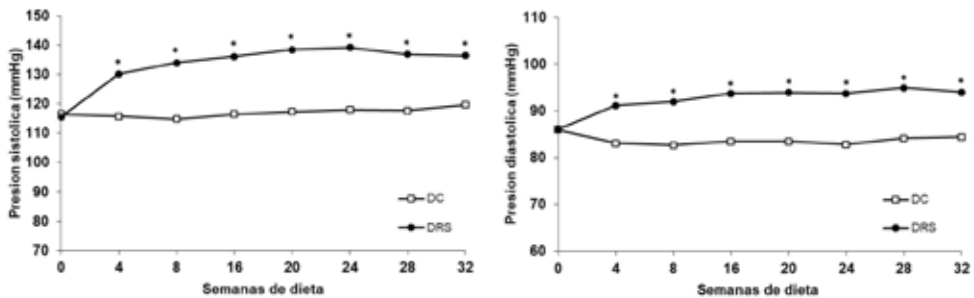
	DC	DRS
<b>Peso corporal (g)</b>		
Inicial	186.5 ± 3.7	187.0 ± 2.8
Final	488.0 ± 6.2	518.3 ± 5.6 *
<b>Ingesta calórica (kJ/día)</b>		
Inicial	270.4 ± 9.7	275.1 ± 10.0
Final	276.8 ± 12.6	346.3 ± 10.8 *
<b>Parámetros plasmáticos</b>		
TG (mM)	0,67 ± 0,04	1,65 ± 0,05 *
AGNE (μM)	314,0 ± 10,2	721,0 ± 20,5 *
Glucosa (mM)	6,2 ± 0,2	8,1 ± 0,3 *
Insulina (pM)	375,0 ± 30,3	368,0 ± 28,3

Los valores se expresan como media ± SEM; n = 6. \* p<0.05 DRS vs. DC.

### Presión sanguínea

Los niveles de presión sistólica y diastólica fueron similares al comienzo del periodo experimental. Los animales del grupo DRS presentaron un significativo aumento en la

presión arterial (sistólica y diastólica) a partir de las 4 semanas desde el inicio del período experimental en comparación con animales de la misma edad alimentados con DC. (Figura 1).



**Figura 1.** Presión arterial sistólica y diastólica durante el periodo experimental en los animales alimentados con dieta control (DC) y dieta rica en sacarosa (DRS).

Los resultados son expresados como media ± SEM (n=6). \* p<0.05 DRS vs. DC en cada punto.

### Niveles plasmáticos de citoquinas inflamatorias, grupos carbonilos en proteínas y ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Los niveles plasmáticos de las citoquinas inflamatorias IL-6 y TNFα, y los marcadores

de estrés oxidativo TBARS y grupos carbonilos en proteínas presentaron un incremento significativo en los animales alimentados con DRS comparado con los animales controles (Tabla 4).

Tabla 4. Niveles plasmáticos de citoquinas inflamatorias, TBARS y grupos carbonilos en proteínas en ratas alimentadas con dieta control (DC) y dieta rica en sacarosa (DRS).

	DC	DRS
IL-6 (pg/ml)	35,62 ± 8,34	79,58 ± 15,96 *
TNF $\alpha$ (pg/ml)	5,79 ± 0,14	15,14 ± 0,49 *
TBARS (nmol/ml)	2,65 ± 0,20	4,91 ± 0,39 *
Grupos carbonilos (nmol/ml)	33,92 ± 0,87	39,03 ± 1,44 *

Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM; n = 6. \* p<0.05 DRS vs. DC.

### 3.4. Actividades y expresión génica de enzimas antioxidantes en musculo cardiaco

La Figura 2 muestra las actividades y expresión génica de las enzimas antioxidantes SOD y GPx en musculo cardiaco. Las actividades enzimáticas de SOD y GPx

se encuentran disminuidas en el grupo DRS comparado con el grupo DC. El comportamiento de la expresión génica de ambas enzimas es diferente, mientras el ARNm de la SOD acompaña la actividad de la enzima, el ARNm de GPx no presenta modificaciones respecto al grupo DC.

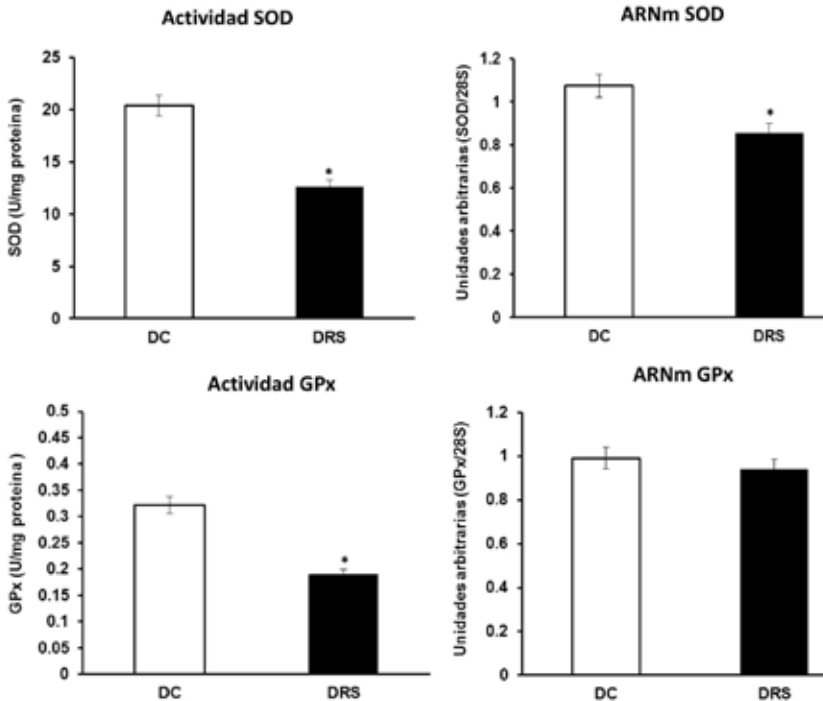


Figura 2. Actividad enzimática y expresión ARNm de la superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en musculo cardiaco en los animales alimentados con dieta control (DC) y dieta rica en sacarosa (DRS). Los resultados son expresados como media  $\pm$  SEM (n=6). \* p<0.05 DRS vs. DC.

## Discusión

El presente trabajo analizó los efectos de la DRS sobre algunos aspectos del estrés oxidativo en músculo cardíaco. Los hallazgos observados hasta el presente son: **1)** Significativa reducción de las actividades GPx y SOD en músculo cardíaco con un comportamiento disímil en sus expresiones génicas; **2)** En plasma: incremento significativo de los niveles plasmáticos de las citoquinas inflamatorias IL-6 y TNF y de la peroxidación lipídica y grupos carbonilos en proteínas, como marcador de daño oxidativo. Estos efectos se acompañaron de dislipemia, moderada hiperglucemia, hipertensión e incremento en el peso corporal y la ingesta calórica.

Similarmente, estudios de Busserolles y col. (7) en ratas normales observaron que la administración de dieta rica en sacarosa durante dos semanas produjo un aumento de TBARS y una menor actividad de Cu-Zn-SOD en el corazón de estos animales cuando se los compara con ratas del mismo sexo y edad alimentadas con dieta control. Una disminución de las actividades enzimáticas SOD y GPx fue también constatado por Roberts y col. (3) en la aorta de ratas Fischer alimentadas por 7 meses con una dieta rica en grasas y azúcares refinados. Estos autores sugieren que los cambios observados podrían promover en estos animales estrés oxidativo, disfunción endotelial, hipertensión y enfermedad cardiovascular. Por otra parte, Ballal y col. (25) while a high fat diet (60% fat observaron que la administración de una dieta alta en calorías (45% de grasa) a ratas Wistar por 48 semanas induce obesidad y disfunción cardíaca, en cual se observó una reducción en la expresión cardíaca de la SOD y GPx.

Además, nuestros resultados muestran un aumento significativo en los niveles plas-

máticos de citoquinas inflamatorias, TBARS y grupos carbonilos de proteínas, lo cual podría contribuir al estado proinflamatorio observado en este modelo. En línea con nuestros hallazgos, Liu y col. (26) demostraron en ratas machos Sprague-Dawley alimentadas con una dieta rica en fructosa (63,1%) durante 21 semanas un incremento significativo en las concentraciones plasmáticas de TNF- $\alpha$  e IL-6.

Finalmente, estos resultados muestran un aumento significativo en la presión diastólica y sistólica en los animales alimentados con DRS. Si bien, al presente no conocemos los mecanismos íntimos que conducen a dicha alteración en este modelo nutricional, un resultado similar fue observado en ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 2 semanas con dieta rica en fructosas (66% en energía) (27). Más aún, Poudyal y col. (28) trabajando con ratas alimentadas crónicamente (32 semanas) con dieta rica en carbohidratos y grasa observaron hipertensión asociado a alteraciones cardíacas tales como dimensión del ventrículo izquierdo, contractibilidad, volumen, rigidez, inflamación y depósito de colágeno.

## Conclusión

En resumen, los resultados alcanzados en este trabajo aportan nuevos datos sobre los efectos de la administración crónica de una dieta rica en sacarosa en el comportamiento de las enzimas antioxidantes GPx y SOD en el músculo cardíaco. Estos datos preliminares, junto a los observados a nivel plasmático de las citoquinas inflamatorias y marcadores del estrés oxidativo sugieren su contribución a la desregulación de la función del músculo cardíaco en este modelo animal.



### Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por subsidios la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) PICT 945/2011 y CONICET PIP #0105/2011. Los autores agradecen a la Dra. M.S. Gimenez y su equipo, Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, por el aislamiento de ARN y análisis semi-cuantitativo de RT-PCR.

### Referencias bibliográficas

1. Bruce, K.; Hanson, M. 2010. The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. *J. Nutr.* **140**, 3 :648-652.
2. Korkmaz, G.G.; Altinoglu, E.; Civelek, S.; Sozer, V.; Erdenen, F.; Tabak, O.; Uzun, H. 2013. The association of oxidative stress markers with conventional risk factors in the metabolic syndrome. *Metabolism* **62**, 6: 828–835.
3. Roberts, C.K.; Barnard, R.J.; Sindhu, R.K.; Jurczak, M.; Ehdaie, A.; Vaziri, N.D. 2006. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism* **55**, 7:928–34.
4. Noeman, S.A.; Hamooda, H.E.; Baalash, A.A. 2011. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol Metab Syndr.* **3**, 1:17.
5. Busserolles, J.; Rock, E.; Gueux, E.; Mazur, A.; Grolier, P.; Rayssiguier, Y. 2002. Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats. *Br. J. Nutr.* **87**, 4: 337–342.
6. Halliwell, B. 1996. Oxidative stress, nutrition and health. *Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans.* *Free Radic. Res.* **25**, 1 :57–74.
7. Busserolles, J.; Zimowska, W.; Rock, E.; Rayssiguier, Y.; Mazur, A. 2002. Rats fed a high sucrose diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression. *Life Sci.* **71**, 11: 1303–1312.
8. Chen, G.C.; Huang, C.Y.; Chang, M.Y.; Chen, C.H.; Chen, S.W.; Huang, C.J.; Chao, P.M. 2011. Two unhealthy dietary habits featuring a high fat content and a sucrose-containing beverage intake, alone or in combination, on inducing metabolic syndrome in Wistar rats and C57BL/6J mice. *Metabolism.* **60**, 2: 155–64.
9. Wei, Y.; Wang, D.; Topczewski, F.; Pagliassotti, M.J. 2007. Fructose-mediated stress signaling in the liver: implications for hepatic insulin resistance. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 1: 1–9.
10. Lombardo, Y.B.; Chicco, A.G. 2006. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J Nutr Biochem.* **17**, 1: 1–13.
11. Selenscig, D.; Rossi, A.; Chicco, A.; Lombardo, Y.B. 2010. Increased leptin storage with altered leptin secretion from adipocytes of rats with sucrose-induced dyslipidemia and insulin resistance : effect of dietary fish oil. *Metabolism.* **59**, 6: 787–95.
12. Chicco, A.; D'Alessandro, M.E.; Karabatas, L.; Pastorale, C.; Basabe, J.C.; Lombardo, Y.B. 2003. Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *J. Nutr.* **133**, 1: 127–33.
13. Montes, M.; Chicco, A.; Lombardo, Y.B. 2000. The effect of insulin on the uptake and metabolic fate of glucose in isolated perfused hearts of dyslipemic rats. *J. Nutr. Biochem.* **11**, 1 :30–37.
14. Chicco, A.; Soria, A.; Fainstein-Day, P.; Gutman, R.; Lombardo, Y.B. 1994. Multiphasic metabolic changes in the heart of rats fed a sucrose-rich diet. *Horm. Metab. Res.* **26**, 9: 397-403.
15. D'Alessandro, M.E.; Selenscig, D.; Illesca, P.; Chicco, A.; Lombardo, Y.B. 2015. Time course of adipose tissue dysfunction associated with antioxidant defense, inflammatory cytokines and oxidative stress in dyslipemic insulin resistant rats. *Food Funct.* **6**, 4: 1299–309.
16. Ferreira, M.R.; Alvarez, S.M.; Illesca, P.; Gimenez, M.S.; Lombardo, Y.B. 2016. Dietary Salba

- (*Salvia hispanica* L.) ameliorates the adipose tissue dysfunction of dyslipemic insulin-resistant rats through mechanisms involving oxidative stress, inflammatory cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Eur. J. Nutr.*;1–12. doi: 10.1007/s00394-016-1299-5. Epub 2016 Aug 26.
17. Reeves, Nielsen F.H.; Fahey, G.C. 1993. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* **123**, 11: 1939–1951.
18. Herbert V.; Lau K-S, Gottlieb C.W.; Bleicher S.J. 1965. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol.* **25**, 10:1375-1384.
19. Paglia, DE V.W. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**,1: 158–169.
20. Kakkar, P.; Das, B.; Viswanathan, P.N. 1984. Modified spectrophotometric assay of SOD. *Indian J. Biochem. Biophys.* **21**, 2: 130-132.
21. D'Alessandro, M.E.; Chicco, A.; Karabatas, L.; Lombardo, Y.B. 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**, 5: 273–80.
22. Glantz, G. 2005. *Primer of Biostatistic*. McGraw Hill, New York.
23. Snedecor, GWP; Cochran, WG. 1967. "Statistical methods". Ames (Iowa): Iowa University Press; 339–350.
24. Hein, G.J.; Bernasconi, A.M.; Montanaro, M.A.; Pellon-Maison, M.; Finarelli, G.; Chicco, A.; Lombardo, Y.B.; Brenner, R.R. 2010. Nuclear receptors and hepatic lipidogenic enzyme response to a dyslipidemic sucrose-rich diet and its reversal by fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **298**, 3: E429–E439.
25. Ballal, K.; Wilson, C.R.; Harmancey, R.; Taegtmeier, H. 2013. Obesogenic High Fat Western Diet Induces Oxidative Stress and Apoptosis in Rat Heart. *Mol. Cell. Biochem.* **344**, 1-2: 221-230
26. Liu, S.H.; Cai, F.Y.; Chiang, M.T. 2015. Long-term feeding of chitosan ameliorates glucose and lipid metabolism in a high-fructose-diet-impaired rat model of glucose tolerance. *Mar. Drugs.* **13**,12: 7302–13.
27. Hwang, YH.; Ho, H.; Hoffman, BB.; Reaven, GM. 1987. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* **10**, 5: 512–516.
28. Poudyal, H.; Panchal, S.K.; Ward, L.C.; Waanders, J.; Brown, L. 2012. Chronic high-carbohydrate, high-fat feeding in rats induces reversible metabolic, cardiovascular, and liver changes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **302**, 12: E1472-1482.