

Trabajo completo

Estado oxidativo y contenido de leptina en el tejido adiposo de ratas alimentadas crónicamente con una dieta rica en sacarosa

RECIBIDO: 14/06/2010

ACEPTADO: 09/09/2010

Selenscig D. • Lombardo Y. B. • Chicco A.

Departamento de Ciencias. Biológicas, Cátedra de Química Biológica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo. (3000) Santa Fé.

RESUMEN: Los objetivos de este trabajo fueron analizar en el tejido adiposo epididimal de ratas Wistar alimentadas durante 8 meses con dieta rica en sacarosa (DRS): 1) si la adiposidad visceral se relaciona con un incremento del estrés oxidativo y 2) si la disminución de los niveles plasmáticos de leptina se correlacionan con su contenido intracelular. Los animales alimentados con DRS mostraron un incrementado contenido de leptina en el tejido adiposo que se correlaciona negativamente con los niveles de leptina circulante y positivamente con la adiposidad visceral. Además, se observó un incremento de la actividad xantino oxidasa, menor actividad glutation peroxidasa y un significativo aumento del contenido de TBARS. Los resultados obtenidos sugieren que el incremento de la adiposidad visceral en ratas alimentadas con DRS conduciría a una disfunción del adipocito que se manifiesta en un incremento en el estrés

oxidativo y alteración en la secreción de adipocitoquinas (leptina y adiponectina).

PALABRAS CLAVES: dieta rica en sacarosa, adiposidad, leptina, estrés oxidativo.

SUMMARY: The objectives of this study were to analyze in epididymal adipose tissue of Wistar rats fed for 8 months with sucrose rich diet (SRD): 1) whether or not visceral adiposity is associated with increased oxidative stress and 2) whether or not the decreased plasma leptin levels correlate with the leptin fat pad content. Adipose tissue of SRD-fed animals showed an increased content of leptin which is negatively correlated with circulating leptin levels and positively correlated with visceral adiposity. In addition, fat pad showed an increase of xanthine oxidase and reduced glutathione peroxidase activities and a significant increase in the TBARS content. The results suggest that increased visceral fat in rats fed SRD lead to adipocyte

dysfunction manifested in an increase in oxidative stress and altered secretion of adipocytokines (leptin and adiponectin).

KEY WORDS: sucrose-rich diet; adiposity; leptin; oxidative stress.

Introducción

La resistencia insulínica (RI), el sobrepeso y la adiposidad visceral son características centrales del síndrome metabólico. Este síndrome, de gran prevalencia en todo el mundo, también incluye entre otras anomalías hipertensión, dislipemia y diabetes mellitus tipo 2 (1) y se ha visto que factores tanto genéticos como ambientales contribuyen a su desarrollo. Varios aspectos del síndrome metabólico pueden ser inducidos en ratas alimentadas con dietas ricas en sacarosa o fructosa. Al respecto, trabajos previos de nuestro grupo demostraron que ratas normales alimentadas crónicamente (30-40 semanas) con una dieta rica en sacarosa (DRS) desarrollan dislipemia, RI periférica global, moderada hiper glucemia y normoinsulinemia, asociado a un incremento moderado del peso corporal y sustancial aumento de la adiposidad visceral (para revisión ver 2).

El tejido adiposo es un activo órgano endocrino que sintetiza y secreta distintas adipocitoquinas, siendo la leptina y adiponectina consideradas como las más importantes (3). La primera se correlaciona con adiposidad y la segunda con RI. Ambas modulan varias funciones biológicas jugando un rol importante en el metabolismo lipídico y glucosídico. En un trabajo previo publicado por nuestro grupo (4) hemos demostrado una disminución de los niveles plasmáticos de ambas adipocitoquinas sin cambios en su expresión génica en el tejido adiposo de ratas alimentadas crónicamente con DRS.

El estrés oxidativo jugaría un rol importante en el desarrollo de la obesidad, RI y parecería estar relacionado con la regulación de las adipocitoquinas. Al respecto, Furukawa y col. (5) demostraron en ratones obesos que la generación de sustancias reactivas del oxígeno se encuentra incrementada selectivamente en el tejido adiposo, dando como resultado RI y desregulación génica de las adipocitoquinas. Por su parte Shen y col. (6) observaron que los niveles de leptina y adiponectina se asocian con los niveles de estrés oxidativo, aunque la relación causa y efecto entre adipocitoquinas y estrés oxidativo permanecen sin aclarar. Más aún, se ha sugerido que el estrés oxidativo en los depósitos grasos es un promotor temprano del síndrome metabólico (7) y existen evidencias de que la hiperlipidemia y las dietas ricas en azúcar, grasa o ambas inducen estrés oxidativo (8).

El estrés oxidativo ocurre cuando las defensas antioxidantes son sobrepasadas por una excesiva producción de sustancias reactivas del oxígeno. El estrés oxidativo del tejido adiposo puede deberse en parte a la acción de la enzima xantino oxidasa, cuya expresión es mucho más elevada en este tejido en comparación con otros (9). Por otra parte, los niveles de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (10) disminuyen en la obesidad conduciendo a una menor defensa antioxidante.

Dada la posible asociación que existe entre obesidad, adipocitoquinas y estrés oxidativo nos propusimos estudiar en el tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas crónicamente con DRS: 1) si la adiposi-

dad visceral se relaciona con un incremento del estrés oxidativo y 2) si la disminución de los niveles plasmáticos de leptina se correlacionan con su contenido intracelular.

Materiales y métodos

Animales y dietas

Se utilizaron ratas macho Wistar provenientes de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Buenos Aires, Argentina; con un peso inicial de 180-200g. 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 12:00 h (7:00-19:00 h). Transcurrida una semana de aclimatación, los animales fueron divididos al azar en dos grupos. 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). Los animales de cada grupo continuaron con sus respectivas dietas hasta alcanzar los 8 meses de ingesta. Las dietas fueron isoenergéticas, proveyendo aproximadamente 16,3 kJ/g de comida y se administraron *ad libitum*. El peso de cada animal fue registrado dos veces por semana durante el transcurso de la experiencia. Se determinaron las ingestas calóricas y las ganancias de peso individuales de las ratas pertenecientes a los distintos grupos dietarios. El alimento fue removido al finalizar el periodo de oscuridad (7:00 h) y los diferentes ensayos fueron realizados entre las 9:00 y 12:00 h. Las ratas de cada grupo dietario fueron sacrificadas por deca-

pitación, las muestras de sangre obtenidas fueron recolectadas y centrifugadas inmediatamente a $3500 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . El suero obtenido se procesó inmediatamente o fue conservado a -20°C hasta su ensayo. El tejido adiposo epididimal fue removido totalmente y rápidamente pesado. El mismo fue procesado de inmediato o congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta su uso. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Investigación Humana y Animal de la facultad de Bioquímica, Universidad Nacional del Litoral (Santa Fé, Argentina).

Métodos Analíticos

Los niveles plasmáticos de triglicéridos, ácidos grasos libres (AGNE) y glucosa fueron determinados por métodos espectrofotométricos convencionales. Los niveles de insulina inmunoreactiva fueron determinados por el método de Herbert y col. (11) utilizándose la insulina de rata como estándar. La leptina y adiponectina plasmática se determinaron usando un kit de ELISA para rata (Linco Research Inc. USA).

Determinación del contenido de leptina en el tejido adiposo

Muestras de tejido adiposo epididimal frescas fueron homogenizadas en buffer TES pH=7,4 (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 225 mM, PMSF 0,1 mM, pepstatin 0,036 mM, Triton X-100 1%), usando un homogenizador de vidrio de acuerdo a Peyron-Caso y col. (12). Los homogenatos fueron centrifugados a $12000 \times g$ por 10 minutos a 4°C y el contenido de leptina en la fase citosólica fue determinado utilizando un kit de ELISA para rata. Los datos son expresados como nanogramos por gramo de tejido húmedo.

Actividad enzimática xantino oxidasa

La purificación de la xantino oxidasa (XO) se realizó acorde al método de Maia y col. (13), con algunas modificaciones. Brevemente, el tejido adiposo fue homogenizado en 3 vol. de buffer fosfato 50 mM, EDTA 0,4 mM, PMSF 100 mM, pH=7,8. El homogenato obtenido fue rápidamente calentado a 55°C con agitación en un baño termostático durante 10 minutos, y posteriormente enfriado en baño de hielo con agitación por debajo de los 10°C. El homogenato fue centrifugado a 16000 x g por 20 minutos a 4°C, el precipitado fue descartado y al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio sólido hasta lograr un 60% de saturación. La solución se agitó durante 30 minutos y el precipitado colectado por centrifugación fue disuelto en buffer fosfato 50 mM, pH=7,8. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (14). La actividad de la XO fue medida en alícuotas de 80 a 180 µg de proteínas en buffer fosfato 50 mM (pH= 7,8) y xantina 0,5 mM a 37°C, monitoreando la producción de ureato a 295 nm [$\epsilon = 12.2 \times 10^{-3} \text{ ml}/(\text{nmol} \times \text{cm})$]. Una unidad de actividad catalítica es definida como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 µmol/min de sustrato bajo las condiciones experimentales. Los resultados se expresan como mU/mg proteína.

Actividad enzimática glutatión peroxidasa

Para el ensayo de la glutatión peroxidasa (GPX) el tejido adiposo fue homogenizado en 4 vol. de buffer de homogenización (Na₂HPO₄ 30 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 250 mM, pH=7,4) y centrifugado a 5000 x g por 10 minutos a 4°C. El infranadante obtenido fue nuevamente centrifugado a 100000 x g por 60 minutos a 4°C

(7). En el sobrenadante post-mitocondrial se determinó: la concentración de proteína por el método de Lowry (14) y la actividad de la GPX por el método espectrofotométrico descrito previamente por Paglia y col. (15). Brevemente, alícuotas de 270 a 510 µg de proteínas se adicionaron a un buffer fosfato 0,05 M pH=7 adicionado de EDTA 5 mM, glutatión reductasa 0,36 U/ml, Na₂S₂O₃ 4,02 mM, glutatión 5,36 mM y NADPH 0,30 mM. La mezcla de reacción se equilibró a 20°C por 5 minutos. Posteriormente la reacción fue iniciada por el agregado de H₂O₂ 78,5 µM. La conversión de NADPH a NADP se registró cada 15 segundos observando el cambio de absorbancia a 340 nm durante un periodo de 3 a 5 minutos. Una unidad de actividad catalítica es definida como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 µmol/min de sustrato bajo las condiciones experimentales. Los resultados se expresan como mU/mg proteína.

Contenido de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBA)

La medida de las especies reactivas del TBA (TBARS) en el tejido adiposo se realizó por el método descrito por Lee y col. (16). El contenido de TBARS en el tejido adiposo se calculó como equivalentes de malondialdehído (MDA) a partir de la curva estándar obtenida utilizando concentraciones crecientes de MDA. Los resultados se expresan como nmol/mg proteína x órgano total.

Análisis Estadístico

Los tamaños de las muestras fueron calculados en la base de medidas hechas previamente en nuestro laboratorio con ratas alimentadas con DC y DRS (4,17), considerando un poder de 80%. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. El análisis

sis estadístico se realizó por el test de Student (18). Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Peso corporal, peso del tejido adiposo epididimal e ingesta calórica:

En los dos grupos dietarios el peso corporal y la ingesta calórica fueron cuidado-

samente monitoreados a través de todo el periodo experimental. Como hemos demostrado previamente (4), se observa un incremento significativo ($p < 0,05$) en el peso corporal y en el peso del tejido adiposo epididimal así como en la ingesta calórica en las ratas crónicamente alimentadas con una DRS durante 8 meses cuando se las compara con el grupo alimentado con DC (Tabla 1).

Tabla 1: Peso corporal y del tejido adiposo epididimal e ingesta calórica de ratas alimentadas con dieta control (DC) y dieta rica en sacarosa (DRS).

Dieta	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal a 240 días (g)	Peso Tejido Adiposo epididimal (g)	Ingesta calórica (kJ/día)
DC	186,4 ± 6,1	469,9 ± 11,6	7,61 ± 0,41	274,9 ± 16,7
DRS	190,4 ± 8,5	565,1 ± 10,2 #	14,46 ± 0,72 #	356,3 ± 20,3 #

Los valores se expresan como media ± SEM, al menos 8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. # $p < 0,05$ DRS vs DC.

Niveles plasmáticos de Tg, AGNE, lípidos, glucosa, insulina y adiponectina

En la Tabla 2 observamos que los niveles de triglicéridos, AGNE y glucosa plasmáticos fueron significativamente más elevados en las ratas alimentadas con DRS

por 8 meses comparadas con las ratas que recibieron una DC por el mismo periodo de tiempo. No se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de insulina en ambos grupos dietarios mientras que los niveles de adiponectina plasmáticos dis-

Tabla 2: Niveles plasmáticos de triglicéridos (Tg), ácidos grasos no esterificados (AGNE), insulina, glucosa y adiponectina en ratas alimentadas con dieta control (DC) y dieta rica en sacarosa (DRS) al final del período experimental.

Dieta	Tg (mM)	AGNE (μ M)	Insulina (pM)	Glucosa (mM)	Adiponectina (μ M)
DC	0,96 ± 0,06	335 ± 32	375 ± 30	6,45 ± 0,07	2,63 ± 0,46
DRS	2,27 ± 0,13 #	850 ± 48 #	369 ± 39	8,20 ± 0,10 #	1,83 ± 0,21 #

Los valores se expresan como media ± SEM, al menos 8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. # $p < 0,05$ DRS vs DC.

minuyeron significativamente ($p < 0,05$) en el grupo DRS respecto al grupo DC.

Contenido de leptina plasmática y tisular

La Tabla 3 describe los niveles de leptina plasmática y su contenido en tejido adiposo epididimal. Los resultados muestran que, en las ratas alimentadas con DRS, la disminución de los niveles plasmáticos de leptina se correlacionan negativamente con

un incremento en la concentración de esta adipocitoquina en el tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas crónicamente con DRS. Por otro lado, el mayor contenido de leptina del tejido adiposo se correlaciona positivamente con el aumento de peso de dicho tejido (Tabla 1) ($n=16$, $r^2=0,947$, $p < 0,05$).

Dieta	Leptina	
	Plasmática (ng/ml)	Tejido Adiposo (ng/gr T. Húmedo)
DC	14,21 ± 1,80	38,71 ± 3,28
DRS	9,60 ± 0,93 #	80,83 ± 5,01 #

Los valores se expresan como media ± SEM, al menos 8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. # $p < 0,05$ DRS vs DC.

Tabla 3. Niveles de leptina plasmática y su contenido en tejido adiposo epididimal en ratas alimentadas con dieta control (DC) y dieta rica en sacarosa (DRS) al final del período experimental.

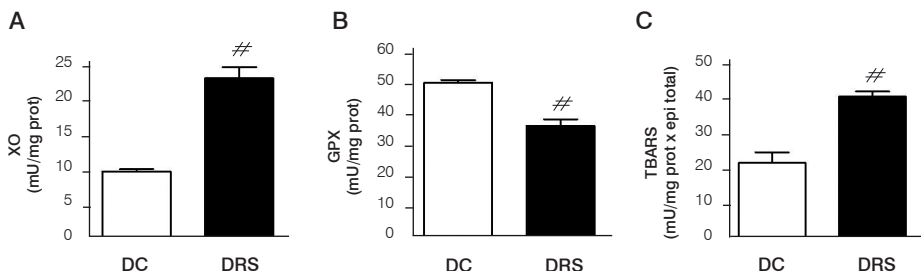
Actividades enzimáticas xantino oxidasa y glutatión peroxidasa y niveles de TBARS en tejido adiposo epididimal:

La actividad de la enzima xantino oxidasa (XO) y el contenido de TBARS en el tejido adiposo de las ratas alimentadas con DRS es significativamente mayor ($p < 0,05$) res-

pecto del grupo que recibió la DC (Figura 1A y Figura 1C). Por otro lado, la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GPX) es significativamente menor ($p < 0,05$) en los animales alimentados con DRS comparada al grupo DC (Figura 1B).

Figura 1: Niveles de la enzima xantino oxidasa (XO) (A) y glutatión peroxidasa (GPX) (B) y de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (C) en tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con dieta control (DC) y dieta rica en sacarosa (DRS) al final del período experimental:

Los valores se expresan como media ± SEM, al menos 8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. # $p < 0,05$ DRS vs DC.



Discusión

Ampliando estudios previos, los resultados obtenidos indican que la administración crónica de una dieta rica en sacarosa (DRS) conduce a un marcado incremento en el contenido de leptina en tejido adiposo que se correlaciona negativamente con los niveles de leptina plasmática. A su vez, observamos que la DRS produce un incremento del estrés oxidativo en el tejido adiposo, debido a un aumento de la actividad enzimática de la xantina oxidasa (XO) y de la peroxidación lipídica junto con una disminución de las defensas antioxidantes, medida a través de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPX) asociado a una mayor adiposidad visceral.

Frederich y col. (19) demostraron que los niveles plasmáticos de leptina, que reflejan la suma de toda la producción de leptina periférica, se correlacionan con el contenido de grasa corporal y el tamaño de los adipocitos en ratones obesos así como en ratones de peso normal. Sin embargo, el aumento moderado de peso corporal, así como la adiposidad y la hipertrofia celular observada previamente (4) en las ratas alimentadas con una DRS se correlacionan negativamente con los niveles plasmáticos de leptina, que disminuyen respecto a la DC. Tanto el estado nutricional como el estímulo hormonal podría afectar el almacenaje, secreción o degradación de la leptina sintetizada de novo para regular la liberación de la misma (20, 21). Adipocitos más grandes contienen una mayor cantidad de leptina comparado con los adipocitos más pequeños, tanto en ratas como en humanos (20, 22). El incremento del peso del tejido adiposo y el contenido de leptina acompañado de un decrecimiento de los niveles plasmáticos de leptina sugieren una alterada secreción de esta adipocitoquina en los anima-

les alimentados con DRS. Soria y col. (23) demostraron un significativo incremento del glicerol liberado basal y en presencia del estímulo con isoproterenol (lipólisis estimulada) en adipocitos de ratas alimentadas con DRS respecto a las alimentadas con DC. Este incremento de los ácidos grasos intracelulares generados como consecuencia de una elevada lipólisis podría jugar un rol importante en la secreción de leptina. Estudios "in vitro" usando adipocitos aislados de ratas normales han mostrado, además, que la insulina estimula la secreción de leptina (24), por lo que diferentes factores y/o mecanismos podrían estar participando en la regulación de la liberación de leptina cuando RI y adiposidad son inducidas en ratas por una DRS.

Diferentes trabajos (6, 25, 26) observaron una relación positiva entre los niveles de estrés oxidativo y leptina. Si bien, el mecanismo por el cual la leptina estimula las condiciones de estrés oxidativo no está completamente dilucidado, podría estar relacionado al hecho de que la leptina estimula la oxidación de ácidos grasos mitocondriales e incrementa la generación de radicales reactivos (27). Nuestros resultados muestran una elevada peroxidación lipídica (aumento de TBARS) en el tejido adiposo de ratas alimentadas con DRS. Al respecto, Furukawa y col. (5) y Lee y col. (28) observaron un incremento de los TBARS en el tejido adiposo de ratones obesos comparados con los controles. En otros modelos de obesidad, esta asociación no es siempre observada. Al respecto, Sutherland y col. (29) no encontraron diferencias en el contenido de TBARS en el tejido adiposo epididimal de ratas Wistar alimentadas por 6 semanas con una dieta rica en grasa respecto a las alimentadas con una DC. Por último, Gallinier y

col. (7) encontraron una disminución en los niveles de TBARS en el tejido adiposo epididimal de ratas Zucker obesas comparadas con sus controles normales.

La XO es una enzima clave del estrés oxidativo. Cheung y col. (9) observaron "in vivo" que el incremento en la expresión y actividad de la XO se correlaciona con la acumulación de grasa en ratones ob/ob de 8 semanas respecto a sus controles; mientras que la pérdida de la XO (en ratones XO^{-/-}) se correlaciona con una reducción de su masa grasa. El aumento en la actividad de la XO constatado en ratas alimentadas con DRS concuerda con lo observado por Cheung y col. (9).

Por otro lado, Yang y col. (30) puntualizaron que la actividad de la GPX es importante para predecir el estado redox de un tejido. La menor actividad de la GPX en animales crónicamente alimentados con DRS observada en el presente trabajo, está en concordancia con los resultados de Furukawa y col. (5) que muestran una disminución en la actividad de la GPX en el tejido adiposo blanco de ratones KKAY que presentan resistencia insulínica y obesidad comparados con sus controles C57BL/6 a las 7 y 13 semanas de edad. Esto se acompaña de una disminución en la expresión génica de la GPX a las 7 semanas. Además, se ha demostrado en ratas Zucker obesas (7) y en ratones obesos db/db y ob/ob (28) una menor actividad GPX en tejido adiposo blanco comparada con sus controles etarios. Sin embargo, Girard y col. (8) observaron una disminución, aunque no significativa, en la actividad de la GPX en el tejido adiposo de ratas wistar alimentadas con una dieta enriquecida en fructosa (18%) y ácidos grasos saturados (11%) al compararla con el grupo que recibió DC. Estos hallazgos podrían deberse al porcen-

taje de grasa e hidratos de carbono dietarios utilizados por Girard y col. (8), así como el tiempo de administración de la misma, diferentes a los utilizados en el presente protocolo experimental.

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que el incremento de la adiposidad visceral en ratas alimentadas con DRS conduciría a una disfunción del adipocito que se manifiesta entre otras en un incremento en el estrés oxidativo y alteración en la secreción de adipocitoquinas (leptina y adiponectina).

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y CONICET. Subsidios PICT 05-38157 / 2005, PIP 11220090100105-2010 y CAI+D PI-8-37 2010.

Referencias

1. Cheal KL, Abbasi F, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Ford ES (2004). Relationship to Insulin Resistance of the Adult Treatment Panel III Diagnostic Criteria for Identification of the Metabolic Syndrome. *Diabetes* **53**: 1195 - 1200.
2. Lombardo YB, Chicco A (2006). Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J Nutr Biochem* **17**(1): 1 - 13.
3. Trayhurn P, Beattie JH (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* **60**: 329 - 339.
4. Rossi A, Lombardo YB, Lacorte J, Chicco A, Rouault C, Slama G, Rizkalla SW (2005). Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**: r486 - r494.

5. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* **114**: 1752-1761.
6. Shen XH, Tang QY, Huang J, Cai W (2010). Vitamin E regulates adipocytokine expression in a rat model of dietary-induced obesity. *Experimental Biology and Medicine* **235**: 47 - 51.
7. Gallinier A, Carriere A, Fernandez Y, Caspar-Bauguil, Periquet B, Periquet A, Penicaud L, Castella L (2006). Site specific changes of redox metabolism in adipose tissue of obese Zucker rats. *FEBS Letters* **580**: 6391 - 6398.
8. Girard A, Madani S, El Boustani ES, Belleville J, Prost J (2005). Changes in lipid metabolism and antioxidant defense status in spontaneously hypertensive rats and Wistar rats fed a diet enriched with fructose and saturated fatty acids. *Nutrition* **21**: 240 - 248.
9. Cheung K, Tzamelis I, Pissios P, Rovira I, Gavrilova O, Ohtsubo T, Chen Z, Finkel T, Flier J, Friedman J (2007). Xanthine Oxidoreductase Is a Regulator of Adipogenesis and PPAR α Activity. *Cell Metabolism* **5**: 115 - 128.
10. Chin-Lin Hsu, Chi-Hao Wu, Shih-Li Huang, Gow-Chin Yen (2009). Phenolic Compounds Rutin and o-Coumaric Acid Ameliorate Obesity Induced by High-Fat Diet in Rats. *J Agric Food Chem* **57**: 425 - 431.
11. Herbert V, Lau KS, Gottlieb CW, Bleicher SJ (1965). Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocr Metab* **25**: 1375 - 1384.
12. Peyron-Caso E, Taverna M, Guerre-Millo M, Véronèse A, Pacher N, Slama G, Rizkalla SW (2002). Dietary (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids Up-Regulate Plasma Leptin in Insulin-Resistant Rats. *J Nutr* **132**: 2235 - 2240.
13. Maia L, Mira L (2002). Xanthine oxidase and aldehyde oxidase: a simple procedure for the simultaneous purification from rat liver. *Biochem Biophys* **400**: 48 - 53.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265 - 275.
15. Paglia DE, Valentine WN (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* **70**: 158 - 169.
16. Lee HS, Csallany AS (1987). Measurement of free and bound malondialdehyde in vitamin E-deficient and-supplemented rat liver tissues. *Lipids* **22**: 104 - 107.
17. Rossi AS, Lombardo YB, Chicco AG (2009). Lipogenic enzyme activities and glucose uptake in fat tissue of dyslipemic, insulin-resistant rats: effects of fish oil. *Nutrition* **26**: 209 - 217.
18. Snedecor G, Cochran W (1967). *Statistical methods applied to experimental in agricultural and biology*. Ames (Iowa): the Iowa State University Press. Pp 339 - 350.
19. Frederich R, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell B, Flier J (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine* **1**: 1311 - 1314.
20. Lee MJ, Fried SK (2006). Multilevel regulation of leptin storage, turnover and secretion by feeding and insulin in rat adipose tissue. *J Lipid Res* **47**: 1984 - 1993.
21. Roh C, Thoidis G, Farmer SR, Kandror KV (2000). Identification and characterization of leptin-containing intracellular compartment in rat adipose cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: E893 - E899.
22. Lee MJ, Wang Y, Ricci M, Sullivan S, Russell CD, Fried SK (2007). Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethasone in human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**: E858 - E864.
23. Soria A, Chicco A, D' Alessandro ME, Rossi A, Lombardo YB (2002). Dietary fish oil reverse epididymal tissue adiposity, cell hypertrophy and

insulin resistance in dyslipemic sucrose fed rat model. *J Nutr Biochem* **13**: 209 - 218.

24. Cammissotto PG, Bukowiecki LJ (2002).

Mechanism of leptin secretion from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*

283: C244 - C250.

25. Bouloumié A, Marumo T, Lafontan M, Busse R (1999). Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* **13**: 1231 - 1238.

26. Bełowski J, Wójcicka G, Jamroz A (2003).

Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia.

Atherosclerosis **170**: 21 - 29.

27. Marjani A, Veghari G, Badeleh M (2010).

Serum lipid peroxidation and leptin levels in male and female type 2 diabetic patients in Gorgan (South East of Caspian Sea), Iran. *J Chin Clin Med* **51**: 26 - 35.

28. Lee YS, Kim AY, Choi JW, Kim M, Yasue S, Son HJ, Masuzaki H, Park KS, Kim JB (2008).

Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Mol Endocrinol* **22**: 2176 - 2189.

29. Sutherland LN, Capozzi LC, Turchinsky NJ, Bell RC, Wright DC (2008). Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue

mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**: E1076 - E1083.

30. Yang MS, Chan HW, Yu LC (2006). Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities

are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology*

226: 126 - 130.