

Trabajo completo

Adaptación de la célula β en dislipemia e insulinoresistencia inducida por dieta rica en sacarosa. Rol de la glucoquinasa

RECIBIDO: 20/07/10

ACEPTADO: 16/09/10

Ferreira, M. R. • Chicco, A • Lombardo, Y. B.

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas.

Universidad Nacional del Litoral.

Ciudad Universitaria. Pje. El Pozo CC 242

3000 – Santa Fe.

Argentina.

Teléfono: 0342 – 4575211

e-mail: ylombard@fbc.unl.edu.ar – Dra. Yolanda B. Lombardo

RESUMEN: Animales alimentados con dieta rica en sacarosa (DRS) presentan dislipemia y resistencia insulínica (RI), que evoluciona con la cronicidad de la dieta desde normoglucemia e hiperinsulinemia a moderada hiperglucemia y normoinsulinemia, deteriorándose progresivamente el patrón de secreción de insulina. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si cambios en la actividad de las enzimas fosforilantes de la glucosa (glucoquinasa y hexoquinasa) en la célula β estarían involucrados en la alterada secreción de insulina observada en estos animales. Ratas Wistar recibieron DRS o dieta control (DC) durante 3 o 30 semanas. Cuando la DRS se administró por un corto período de tiempo (3 semanas) no se observaron cambios en la actividad de las enzimas. Luego de un período prolongado de ingesta de DRS la actividad glucoquinasa disminuyó sin cambios en la

actividad hexoquinasa. La menor actividad glucoquinasa podría ser uno de los factores involucrados en la deteriorada secreción de insulina observada en animales alimentados crónicamente con DRS.

PALABRAS CLAVES: Célula β – Insulino Resistencia – Dislipemia – Glucoquinasa.

SUMMARY: *β cell adaptation in dyslipemia and insulin resistance induced by sucrose rich diet. Role of Glucokinase.*

Animals fed a sucrose rich diet (SRD) show dyslipemia and insulin resistance (IR) that evolve from normoglycemia and hyperinsulinemia to moderate hyperglycemia and normoinsulinemia with the length of time the diet is consumed. This is accompanied by a progressive deterioration in insulin secretion pattern. The aim of the present work was to evaluate if changes in the activity of β cell glucose phosphorylating enzymes (glucokinase

and hexokinase) would be involved in the altered insulin secretion observed in this animals. Wistar rats received SRD or control diet (CD) for 3 or 30 weeks. When the SRD was administered for a short period of time (3 weeks) no changes were observed in the activity of both enzymes. After a prolonged period of SRD intake glucokinase activity

decreased without changes in hexokinase activity. The decreased glucokinase activity could be some of the factors involved in the impaired insulin secretion observed in animals fed chronically a sucrose rich diet.

KEY WORDS: β cell – Insulin Resistance – Dyslipemia – Glucokinase.

Introducción

El síndrome metabólico es una patología que afecta a millones de personas en el mundo entero. El número de afectados crece a gran velocidad debido principalmente al estilo de vida actual caracterizado por una exagerada ingesta de nutrientes y reducida actividad física. El síndrome metabólico se caracteriza por una constelación de anomalías entre las cuales se incluyen obesidad, hipertensión, dislipemia, resistencia insulínica (RI), anormal tolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. Una manifestación temprana característica de estados de RI es la aparición de anormalidades en el metabolismo de los lípidos en tejidos sensibles a la insulina lo que conduce a un aumento en el flujo de ácidos grasos hacia tejidos no adiposos (hígado, músculo esquelético, célula β) (1). La hiperinsulinemia observada en la RI representa una respuesta compensatoria de la célula β que le permite mantener la normoglucemia. Sin embargo cuando con el transcurso del tiempo esta respuesta falla, debido a factores genéticos o adquiridos, se desarrolla la hiperglucemia.

La administración de una dieta rica en sacarosa (DRS) a animales de experimentación induce dislipemia (incremento de triglicéridos y ácidos grasos libres), alterada homeostasis de la glucosa y RI. Esto parámetros evolucionan con la cronicidad de la

dieta desde normoglucemia e hiperinsulinemia a moderada hiperglucemia y normoinsulinemia acompañadas de un deterioro progresivo en el patrón de secreción de insulina (2).

La secreción de insulina estimulada por la glucosa es una compleja cascada de eventos. La secreción de insulina está directamente relacionada con el flujo glicolítico en el interior de la célula β . El primer paso de esta vía es mediado por la acción de dos enzimas: glucoquinasa (GQ) y hexoquinasa (HQ). Numerosos autores han demostrado que la glucoquinasa tendría un rol clave al actuar como un "glucorreceptor" relacionando los niveles de glucosa externos con la velocidad de secreción de insulina (3,4,5). Además, los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres (AGNE) y glucosa juegan un rol clave en la secreción de la hormona (6).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar si cambios evolutivos en la actividad de las enzimas fosforilantes de la glucosa (glucoquinasa y hexoquinasa) en la célula β podrían estar involucrados en la alterada secreción de insulina observada en los animales alimentados con DRS.

Materiales y métodos

Animales y dietas.

Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso inicial de 180 - 200 g provenientes del

Instituto Nacional de Farmacología (Buenos Aires, Argentina). Los animales se mantuvieron bajo condiciones de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad controladas, con un ciclo de luz oscuridad de 12 horas (07:00 a 19:00) y fueron alimentados con una dieta estandar semisintética (Ralston Purina, St. Louis, MO). Luego de 1 semana de aclimatación, los animales fueron divididos al azar en 2 grupos (control y experimental). El grupo experimental recibió una dieta rica en sacarosa (DRS) conteniendo (g/100g): sacarosa 62,5; caseína libre de vitaminas 17; aceite de maíz 8; celulosa 10, mezcla de sales 3,5 (AIN-93M-MX), mezcla de vitaminas 1 (AIN-93-VX); cloruro de colina 0,2 y DL-metionina 0,3 (7). El grupo control recibió la misma dieta pero con almidón en reemplazo de sacarosa [dieta rica en almidón (DC)]. Detalles de la metodología usada fueron descriptos previamente (8). Los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento y consumieron sus respectivas dietas por 3 o 30 semanas. Las dietas fueron isoenergéticas, provyendo 16,3 kJ/g de comida; y fueron preparadas semanalmente y almacenadas a 4°C . Durante el transcurso de la experiencia se registró el peso de cada animal y se determinó la ingesta calórica 2 veces por semana. Finalizado el período experimental (3 o 30 semanas) el alimento fue removido al finalizar el período de oscuridad (07:00h) y los diferentes ensayos fueron llevados a cabo entre las 09:00 y las 12:00h. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

Métodos analíticos.

Al finalizar el período experimental, los animales de cada grupo dietario fueron decapitados. Las muestras de sangre obtenidas fueron centrifugadas a $3500 \times g$ durante 15 minutos a 4°C y el suero obtenido se procesó inmediatamente o fue almacenado a -20°C hasta su utilización dentro de los 3 días posteriores a la toma de muestra. Los niveles plasmáticos de triglicéridos, ácidos grasos libres (AGNE) y glucosa fueron determinados por métodos espectrofotométricos. La insulina plasmática fue dosada mediante un ensayo inmunorreactivo según se describió previamente (8) utilizando un estándar de insulina de rata (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark). El páncreas de cada uno de los animales fue removido rápidamente y los islotes fueron aislados por digestión con colagenasa y recolectados bajo lupa estereoscópica como se describió previamente (2,9).

Secreción de Insulina.

Los islotes aislados según se describió previamente fueron lavados 2 veces con buffer Krebs-Ringer bicarbonato (KRB). Grupos de 30-40 islotes de cada rata fueron colocados en una cámara de 13-mm conteniendo un filtro de membrana de nylon de $5\text{-}\mu\text{m}$. Los islotes fueron perfundidos con KRB conteniendo 3 mmol/L glucosa, 250 mg/L albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos, 40 mg/L dextran 70, $\text{pH} = 7.4$; a 37°C (gaseado constantemente con 95% O_2 , 5% CO_2) con una velocidad de flujo de 0.9–1.2 mL/min. Luego de un prelavado de 30 minutos se obtuvieron 2 muestras basales. Posteriormente se utilizó KRB conteniendo una alta concentración de glucosa (16.5 mmol/L) hasta el final de la perfusión

(40min). Alícuotas del efluente fueron recolectadas cada minuto hasta los 15 minutos y luego cada 5 minutos hasta el minuto 40. Las alícuotas fueron almacenadas a -20°C hasta ser utilizadas para el dosaje de insulina. Detalles de esta metodología han sido descritos previamente (2,9).

Actividad Glucoquinasa y Hexoquinasa.

La fosforilación de la glucosa fue determinada en islotes según el método descrito por Liang y col. (5). Aproximadamente 300 islotes fueron lavados 2 veces y homogeneizados a 4°C con $300\ \mu\text{l}$ de buffer $20\text{mM K}_2\text{HPO}_4$, $\text{pH}=7.4$ conteniendo 5mM DTT , 1mM EDTA y 110mM KCl . El homogenato fue centrifugado a $12000 \times g$ durante 10 min y el sobrenadante fue utilizado para la determinación de las actividades glucoquinasa y hexoquinasa (4). Brevemente, 1 vol de sobrenadante fue adicionado a 25 vol de buffer de reacción (50mM Hepes/HCl , $\text{pH}: 7.60$, conteniendo 100mM KCl , 7.4mM MgCl_2 , $15\text{mM } \beta\text{-mercaptoetanol}$, 0.50mM NAD^+ , 0.05% albúmina sérica bovina, $0.7\ \text{U/ml}$ glucosa-6-fosfato dehidrogenasa *Leuconostoc mesenteroides*, 5mM ATP y glucosa 5 o $100\ \text{mM}$). Luego de 90 min de incubación a 30°C , la reacción se detuvo mediante el agregado de 250 vol de 500mM NaHCO_3 , $\text{pH}= 9$ y se midió la fluorescencia (excitación 350nm /emisión 460nm). Las muestras para cada concentración de glucosa se procesaron por duplicado en paralelo con un blanco de reactivos (buffer de reacción sin homogenato) y un blanco de muestra (homogenato en buffer de reacción sin glucosa). Tanto el blanco de reactivos como el blanco de muestra fueron sustraídos de la fluorescencia total correspondiente a cada muestra adicionada al buffer de reacción completo. La curva standard se cons-

truyó mediante la adición de glucosa-6-fosfato ($0.4 - 8.3\ \text{mmol}/\mu\text{l}$) al buffer de reacción conteniendo glucosa 100mM . La actividad glucoquinasa se determinó sustrayendo la actividad hexoquinasa medida a una concentración de glucosa 5mM , de la actividad medida a una concentración de glucosa 100mM . La cuantificación de proteínas en el sobrenadante se realizó por el método de Lowry (10).

Análisis estadístico.

Los resultados experimentales se expresan como media \pm SEM. Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron analizadas por *t-test de Student*. Cuando se consideró apropiado los datos fueron sometidos a ANOVA 2×2 con dieta y tiempo como principales efectos (11) seguido por la inspección de todas las diferencias entre pares de medias mediante test de Scheffé. Valores de $p < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

Resultados

Incremento de peso corporal e ingesta calórica.

En la Tabla 1 se observa que el peso corporal y la ingesta calórica de los animales alimentados durante 3 semanas con DRS es similar al del grupo control. Sin embargo, cuando el período experimental se extiende hasta 30 semanas, el grupo alimentado con DRS presenta un incremento significativo ($p < 0.05$) tanto en el peso corporal como en la ingesta calórica al ser comparado con animales alimentados con DC durante el mismo período de tiempo.

Tabla 1: Peso corporal, ganancia de peso e ingesta calórica en ratas alimentadas durante 3 o 30 semanas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).¹

DIETA	Tiempo de ingesta (semanas)	Peso corporal (g)	Ganancia de peso (g)	Ingesta calórica (kJ/día)
DC	3	283.06 ± 4.56 ^c	99.25 ± 3.75 ^c	272 ± 6 ^b
DRS	3	280.81 ± 6.34 ^c	93.38 ± 5.45 ^c	248 ± 9 ^b
DC	30	438.63 ± 18.58 ^b	241.38 ± 15.85 ^b	256 ± 8 ^b
DRS	30	548.44 ± 21.84 ^a	349.63 ± 20.63 ^a	370 ± 11 ^a

ANOVA 2 X 2²

Dieta	S	S	S
Tiempo	S	S	S
Dieta x Tiempo	S	S	S
Error	1766.60	1441.25	457.26

¹ Los valores se expresan como media ± SEM, n=8.

² ANOVA: efecto significativo, S (p<0.05) o no significativo, NS (p≥0.05). Los valores en cada columna que no poseen la misma letra superescrita son significativamente diferentes (p<0.05). DC: dieta control; DRS: dieta rica en sacarosa.

Metabolitos plasmáticos y niveles de insulina.

La Tabla 2 muestra que los animales alimentados con DRS por un corto período de tiempo (3 semanas) presentan niveles plasmáticos de triglicéridos (Tg), AGNE e insu-

lina significativamente superiores (p<0.05) a los observados en animales de igual sexo y edad alimentados con DC. En este período los niveles plasmáticos de glucosa son comparables entre ambos grupos dietarios.

Tabla 2: Metabolitos plasmáticos y niveles de insulina en ratas alimentadas durante 3 o 30 semanas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).¹

DIETA	Tiempo de ingesta (semanas)	Triglicéridos (mM)	AGNE (μM)	Glucosa (mM)	Insulina (pM)
DC	3	0.81 ± 0.09 ^c	251.6 ± 8.1 ^c	6.63 ± 0.10 ^b	373 ± 19 ^b
DRS	3	1.56 ± 0.05 ^b	484.2 ± 24.9 ^b	6.67 ± 0.09 ^b	577 ± 8 ^a
DC	30	0.86 ± 0.08 ^c	287.3 ± 13.1 ^c	6.57 ± 0.07 ^b	369 ± 16 ^b
DRS	30	2.29 ± 0.22 ^a	839.5 ± 32.7 ^a	8.36 ± 0.10 ^a	364 ± 24 ^b

ANOVA 2 X 2

Dieta	S	S	S	S
Tiempo	S	S	S	S
Dieta x Tiempo	S	S	S	S
Error	0.094	2887.67	0.048	1598.59

¹ Los valores se expresan como media ± SEM, n=8.

² ANOVA: efecto significativo, S (p<0.05) o no significativo, NS (p>0.05). Los valores en cada columna que no poseen la misma letra superescrita son significativamente diferentes (p<0.05). DC: dieta control; DRS: dieta rica en sacarosa.

Cuando el período de administración de las dietas se prolonga hasta las 30 semanas los niveles plasmáticos de Tg, AGNE y glucosa del grupo que recibió DRS son superiores a los observados en los animales que recibieron esta dieta durante 3 semanas. En el grupo DC no se observan cambios en estos parámetros en ambos períodos de tiempo. Los niveles de insulina plasmática a las 30 semanas de DRS son comparables a los observados en el grupo DC. El conjunto de estos hallazgos confirma datos obtenidos en publicaciones previas (2,12).

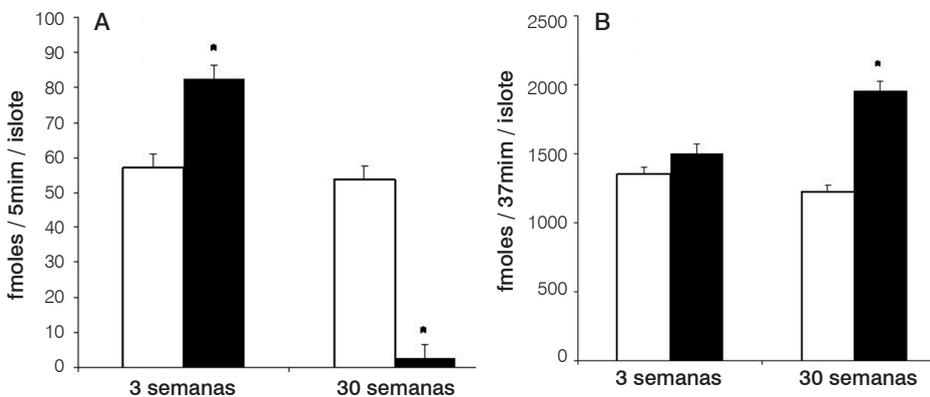
Secreción de insulina

La Figura 1A muestra el total de insulina liberada durante la primera fase de secreción de la hormona (3 – 7 minutos) en islotes perifundidos de ratas alimentadas con DC y DRS a las 3 y 30 semanas de ingesta. En los animales alimentados con DRS durante

3 semanas los valores de insulina liberada en la primer fase son superiores a los valores hallados en los animales alimentados con DC. Sin embargo a las 30 semanas de administración de la dieta en los animales alimentados con DRS no se observa el primer pico de secreción de insulina. Durante este período los niveles de insulina liberados crecen continuamente, no obstante los valores hallados a cada tiempo individual entre los 3-7 min son inferiores a los hallados en los animales alimentados con DC.

En la Figura 1B se observa la secreción total de insulina durante el período de perfusión de los islotes (3-40 minutos). En la misma sólo encontramos diferencia significativa en los animales alimentados con DRS durante 30 semanas. En este grupo el total de insulina liberada es significativamente mayor ($p < 0.05$) que sus respectivos controles etarios.

Figura 1: Secreción de insulina en islotes aislados de ratas alimentadas durante 3 o 30 semanas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).



Los valores se expresan como media \pm SEM ($n=8$), * $p < 0.05$. El panel A muestra la insulina liberada en la primera fase de secreción (minutos 3 a 7). El panel B muestra el total de insulina liberada durante la experiencia (minutos 3 a 40).

□ DC: dieta control; ■ DRS: dieta rica en sacarosa.

Actividad de las enzimas fosforilantes de la glucosa.

La Figura 2A muestra que a las 3 semanas de ingesta no se observan diferencias significativas en la actividad glucoquinasa entre los grupos DC y DRS, mientras que la actividad glucoquinasa es significativamente menor ($p < 0.05$) en los animales alimentados con DRS durante 30 semanas. Por otro lado los niveles de la actividad hexoquinasa son comparables en ambos grupos dietarios en cada período de ingesta. (Figura 2B)

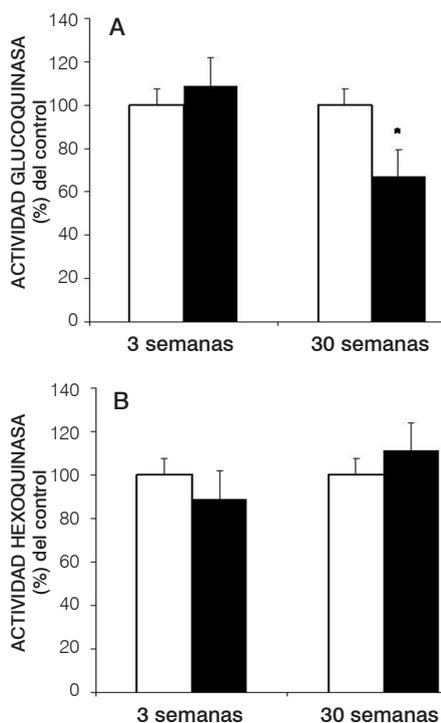
La relación hexoquinasa/glucoquinasa no presentó diferencias estadísticamente significativas en los animales que ingirieron DC o DRS durante 3 semanas (3.85 ± 0.29 vs 4.01 ± 0.39 , DC vs DRS). Sin embargo, esta relación incrementa en el grupo DRS en los animales alimentados durante 30 semanas cuando se comparó con sus respectivos controles etarios (5.47 ± 0.64 vs 3.48 ± 0.14 $p < 0.05$, DRS vs DC).

Discusión

En el presente trabajo evaluamos los cambios evolutivos de la actividad de las enzimas fosforilantes de la glucosa glucoquinasa y hexoquinasa en islotes pancreáticos aislados de ratas alimentadas con DRS que podrían correlacionarse con la evolución en los niveles de glucemia e insulínemia que estos animales experimentan a lo largo del tiempo de ingesta.

Los principales hallazgos del presente trabajo fueron: a) cuando la DRS es administrada por un corto período de tiempo (3 semanas) no se observan cambios significativos en la actividad de ambas enzimas aún en presencia de normoglicemia e hipersulinemia basal. Durante este período la célula β responde a la alterada sensibilidad insulínica de los tejidos periféricos aumen-

Figura 2. Efecto de la administración de una dieta rica en sacarosa sobre la fosforilación de la glucosa en islotes pancreáticos de ratas alimentadas durante 3 o 30 semanas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).



Los valores se expresan como media \pm SEM ($n=8$). * $p < 0.05$. Los valores de actividad se presentan como porcentaje (%) respecto a la dieta control en cada período de administración de las dietas. El panel A muestra la actividad glucoquinasa, el panel B muestra la actividad hexoquinasa.
 □ DC: dieta control; ■ DRS: dieta rica en sacarosa.

tando su respuesta secretora. Como consecuencia de ello la hiperinsulinemia permite mantener los niveles de glucemia normales.; b) con la cronicidad de la dieta la actividad glucoquinasa disminuye significativamente sin cambios en la actividad hexoquinasa. Bajo estas condiciones experimentales la relación hexoquinasa/glucoquinasa se incrementa significativamente ($p < 0.05$) en el grupo DRS respecto a los animales alimentados con DC. Más aún, los niveles de glucemia del grupo DRS incrementan en presencia de normoinsulinemia basal lo que podría deberse, al menos en parte, a una alterada secreción de insulina. La pérdida de la primer fase de secreción de insulina demostrada previamente y corroborada en el presente trabajo, sería un marcador temprano de disfunción de la célula β . Al respecto, numerosos estudios en humanos y en animales de experimentación sugieren la importancia de la primer fase de secreción de la hormona en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa (13).

Si bien la secreción de insulina estimulada por la glucosa es consecuencia de una serie de eventos relacionados, diferentes autores han propuesto que la velocidad de fosforilación de la glucosa en la célula β sería un factor determinante en la velocidad de secreción de la insulina (3,4). Las enzimas involucradas en este proceso son la glucoquinasa y hexoquinasa pancreáticas. Al respecto, diferentes autores han demostrado que cambios mínimos en la actividad y/o masa proteica de la glucoquinasa o en la sensibilidad de la misma a la glucosa, podrían repercutir en la velocidad de secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa (14,15,16).

En el presente trabajo no se han observado variaciones en la actividad de ambas

enzimas fosforilantes en islotes aislados de animales alimentados con DRS durante 3 semanas, aún en presencia de normoglucemia e hiperinsulinemia basal. Sin embargo, no puede descartarse que en estos animales la glucemia postprandial se encuentre alterada o pudiera influenciar la secreción de insulina. En este sentido, Maiztegui y col. han propuesto que un aumento en los niveles de glucosa postprandial sería suficiente para modificar la actividad y expresión de la enzima glucoquinasa (14).

Se ha demostrado que tanto la glucosa como los ácidos grasos pueden ejercer efectos positivos (adaptativos) o negativos (tóxicos) sobre la célula β (6,17) en función del tiempo durante el cual la célula está expuesta a estos metabolitos así como los niveles plasmáticos de los mismos. Los elevados niveles de AGNE plasmáticos podrían potenciar la secreción de insulina en presencia de normoglucemia (3 semanas de ingesta), sin embargo con la cronicidad de la dieta la coexistencia de elevados niveles de glucosa y AGNE plasmáticos ejercerían un efecto negativo sobre la secreción de insulina por medio de mecanismos de glucolipototoxicidad. Los mecanismos por los cuales la hiperglucemia e hiperlipidemia crónicas llevarían a la disfunción de la célula β no están completamente dilucidados, entre otros podrían estar involucrados: alteraciones en el transporte y/o metabolismo de la glucosa, en la expresión de genes claves que controlan el metabolismo de los lípidos en el interior de la célula β , acúmulo de Tg, cambios en la expresión de receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPARs), proteína desacoplante UCP 2, proteínas de unión a los elementos reguladores de esteroides (SREBP 1c), etc. (17,18). Al respecto, otros estudios que utilizan agentes

que son capaces de corregir la dislipidemia y normalizar los niveles de glucemia logran mejorar la secreción de insulina estimulada por la glucosa (9,19).

En este trabajo encontramos que la actividad de una enzima clave del metabolismo de la glucosa como lo es la glucoquinasa se encuentra significativamente disminuída en islotes expuestos de manera crónica a niveles elevados de los metabolitos antes mencionados (30 semanas). Estas alteraciones podrían formar parte de los mecanismos de glucolipototoxicidad. Al respecto, Gremlich y col. observaron una disminución de la masa proteica de la glucoquinasa en cultivo de islotes en presencia de niveles elevados de glucosa y palmitato, que podría conducir al efecto deletéreo de estos metabolitos sobre la enzima (20).

En resumen, luego de un período prolongado de ingesta de DRS el deterioro en el patrón de secreción de insulina observado en ese período y la consecuente aparición de hiperglucemia podría estar asociado entre otros factores a la reducción de la actividad de la enzima glucoquinasa. Además, la ausencia de cambios en la actividad de esta enzima cuando la DRS es administrada por un período corto de tiempo (3 semanas) sugeriría que otros factores incluyendo la expresión de su masa proteica estarían involucrados en la incrementada secreción de la hormona. Este trabajo confirma el rol clave que tiene esta enzima en la regulación de la secreción de insulina y en el normal funcionamiento de la célula β .

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y CONICET. PICT 05-38157 y PIP #11220090100105 2010. Los

autores agradecen a la Sra. Silvia Rodríguez (personal Técnico de CONICET) y al Sr. Walter Da Ru por su asistencia técnica.

Referencias

1. Lewis, G.F.; Carpentier, A.; Adeli, K.; Giacca, A. 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*. **23**, 2 : 201 – 229.
2. 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**: 127–133.
3. Trueheart Burch, P.; Trus, M.D.; Berner, D.K.; Leontire, A.; Zawalich, K.C.; Matschinsky, F.M. 1981. Adaptation of glycolytic enzymes: Glucose use and insulin release in rat pancreatic islets during fasting and refeeding. *Diabetes*. **30**: 923–928.
4. Trus, M.D.; Zawalich, W.S.; Trueheart Burch, P.; Berner, D.K.; Weill, V.A.; Matschinsky, F.M. 1981. Regulation of glucose metabolism in pancreatic islets. *Diabetes* **30**: 911 – 922.
5. Liang, Y.; Najafi, H.; Matchinsky, F.M. 1990. Glucose regulates glucokinase activity in cultured islets from rat pancreas. *J. Biol. Chem.* **265**, 28: 16863 – 16866.
6. Prentki, M.; Joly, E.; El – Assaad, W.; Roduit, R. 2002. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipototoxicity: Role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes*. **51** (3): S405 - S413.
7. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Farley, G.C., Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**: 1939 - 1951.
8. Soria, A.; D' Alessandro, M.E.; Lombardo, Y.B. 2001. Duration of feeding on a sucrose –rich

- diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. *J. Appl. Physiol.* **91**: 2109 – 2116.
- 9.** Chicco ,A.; Basabe ,J.C.; Karabatas, L.; Ferraris, N.; Fortino, A.; Lombardo, Y.B. 2000. Troglitazone (CS-045) normalizes hypertriglyceridemia and restores the altered patterns of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipidemic rats. *Metabolism* **49**, 10:1346 – 1351.
- 10.** Lowry, O.H.; Rosebrough, M.J.; Farr A.L.; Randall, R.L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**: 265 - 75.
- 11.** Snedecor, G.W.P.; Cochran, W. G. 1967. "Statistical methods". Iowa University Press, Ames, IA. pp. 339-350.
- 12.** Lombardo, Y.B.; Drago, S.; Chicco, A.; Fainstein-Day, P.; Gutman, R.; Gagliardino , J.J.; Gomez Dumm, C.L. 1996. 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**, 12: 1527 – 1532.
- 13.** Del Prato, S. 2003. Loss of early insulin secretion leads to postprandial hyperglycaemia. *Diabetología.* **46**: M2 – M8.
- 14.** Maiztegui, B.; Borelli, M.I.; Raschia, M.A.; Del Zotto, H.; Gagliardino, J.J. 2009. Islet adaptative changes to fructose-induced insulin resistance: β cell mass, glucokinase, glucose metabolism, and insulin secretion. *J. of Endocrinol.* **200**: 139-149.
- 15.** Chan, C.B. 1993. Glucokinase activity in isolated islets from obese *fa/fa* Zucker rats. *Biochem. J.* **295**: 673-677.
- 16.** Chen, C.; Hosokawa, H.; Bumbaio, L.M. y Leahy, J.L. 1994. Mechanism of compensatory hyperinsulinemia in normoglycemic insulin-resistant spontaneously hypertensive rats. *J. Clin. Invest.* **94**: 399 – 404.
- 17.** Leahy, J.L.; Bonner-Weir, S.; Weir, G.C. 1992. β -cell dysfunction induced by chronic hyperglycemia. *Diabetes Care* **15**,3: 442 – 455.
- 18.** Poutil, V. 2004. β cell lipotoxicity: Burning fat into heat?. *Endocrinology* **145**,8: 3563 – 3565.
- 19.** Pighin, D.; Karabatas, L.; Rossi, A.; Chicco, A.; Basabe, J.C.; Lombardo, Y.B. 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.
- 20.** Gremlich, S.; Bonny, C.; Waeber, G.; Thorens, B. 1997. Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT-2, glucokinase, insulin and somatostatin levels. *J. Biol. Chem.* **272**,48: 30261 – 30269.