



Mecanismos moleculares implicados en las alteraciones metabólicas inducidas por la suplementación subcrónica de fructosa líquida: estrés de retículo, autofagia y resistencia a la insulina

Miguel Baena Muñoz

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Unidad de Farmacología y Farmacognosia
Departamento de Farmacología y Química Terapéutica
Facultad de Farmacia

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Mecanismos moleculares implicados en las alteraciones metabólicas inducidas por la suplementación subcrónica de fructosa líquida: estrés de retículo, autofagia y resistencia a la insulina

Miguel Baena Muñoz

2015



Unidad de Farmacología y Farmacognosia
Departamento de Farmacología y Química Terapéutica
Facultad de Farmacia

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Mecanismos moleculares implicados en las alteraciones metabólicas inducidas por la suplementación subcrónica de fructosa líquida: estrés de retículo, autofagia y resistencia a la insulina

Memoria presentada por **Miguel Baena Muñoz** para optar al título de doctor por la Universitat de Barcelona

El Director/Tutor,
Dr. Juan Carlos Laguna Egea

La Directora,
Dra. Núria Roglans Ribas

El doctorando,
Miguel Baena Muñoz



Unidad de Farmacología y Farmacognosia

Departamento de Farmacología y Química Terapéutica

Facultad de Farmacia

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Mecanismos moleculares implicados en las alteraciones metabólicas inducidas por la suplementación subcrónica de fructosa líquida: estrés de retículo, autofagia y resistencia a la insulina

Memoria presentada por Miguel Baena Muñoz para optar al título de doctor por la Universitat de Barcelona y dirigida por el Dr. Juan Carlos Laguna Egea y la Dra. Núria Roglans Ribas, investigadores miembros del IBUB (Instituto de Biomedicina de la UB) y del CIBEROBN (CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III).

Esta tesis doctoral se ha realizado gracias a la concesión de una ayuda predoctoral de formación de personal investigador (BES-2011-045090) del Ministerio de Ciencia e Investigación de España, de los proyectos de investigación SGR09-00413 y SGR13-00066 (Generalitat de Catalunya), SAF2010-15664 y SAF2013-42982 (MICINN) y a la financiación de la Fundación Privada Catalana de Nutrición y Lípidos.

"Si puedes soñarlo, puedes hacerlo. Recuerda que todo esto comenzó con un ratón."

(Walt Disney)

A mi abuela

Agradecimientos

“La más larga caminata comienza con un paso”. Así reza un sabio refrán, útil ya sea para hacer una tesis doctoral o para lanzarte a correr una maratón.

Pues bien, aquí acaba una de esas caminatas. Una aventura que comenzó allá por el mes de septiembre de 2003, momento en el que decidí vivir la vida universitaria barcelonesa. Casi 12 años después, y con la sensación de que sería imposible mejorar todo lo vivido desde entonces, ha llegado el momento. Llegados a este punto, resulta imposible no echar la vista atrás y recordar con cariño los momentos disfrutados, así como a todas las personas que los hicieron posible. Siempre he dicho que una persona es el resultado de todas las personas que se va encontrando a lo largo de la vida. En mi caso, esta cita se eleva a su máximo exponencial, y por ese motivo me siento inmesamente feliz por poder dedicar estas líneas, las más personales y emotivas de todas las que forman esta tesis, a esas personas que han hecho posible que este sueño doctoral se haga realidad. Así que disfrutad chicos, ¡estas líneas son vuestras!

Soy consciente de que necesitaría (y de que os merecéis) cientos de páginas para poder expresar del todo lo importante que cada uno de vosotros habéis sido para mí durante todo este tiempo. Intentaré ser breve (me acusan de que me enrolló demasiado), pero que sepáis que eso no implica que olvide cada segundo vivido con vosotros.

En primer lugar quería agradecer a mis directores de tesis Dr. **Juan Carlos Laguna** y Dra. **Núria Roglans** la oportunidad de poder formar parte de su grupo experimental. Probablemente dirigir una tesis sea como llevar las riendas de un caballo, hay que hacerlo “*con mano de hierro en guante de seda*”, y he de decir que, juntamente con la Dra. **Marta Alegret**, resulta imposible encontrar mejores personas que asesoren tu día a día experimental. Gracias a los tres por toda la ayuda prestada desde el primer día. Además, es una inmensa suerte poder compartir poyata cada mañana con uno de tus directores, y hacerlo siempre con tan buen humor. ¡Gracias Nuri!

Una tesis implica miles de horas en un laboratorio, así que si tienes que pasar por eso, ¿qué mejor que hacerlo rodeado de los mejores compañeros posibles? ¡No os cambiaba por nada del mundo, chicos! La lista es interminable, pero considero justo nombraros a todos, ya que sin vosotros, las siguientes páginas no tendrían ningún sentido.

Empezaré por las tres compañeras con las que he tenido suerte de compartir poyata dentro de mi grupo, con las tres personas con las que más horas he compartido entre pipetas y eppendorfs: **Alba**, la mejor maestra que he podido tener (ahora me llamarás “pelota”, lo sé); **Gemma**, mi compi, una medalla por favor para la persona que mejor sabe lo que es tenerme horas y horas delante sin conseguir que me calle, gracias por hacerlo siempre sin perder esa sonrisa y por tratarme con tanto cariño; y **Natty**, fue un placer conocer lo mejor de Argentina (incluimos a **Anibal** en el pack) entre las interminables hora de analíticas murinas en el estabulario. El resto de personas con las que he compartido poyata dentro del *fructosa team* también merecen mi agradecimiento: **Pou**, **Joselito** (mi primer pupilo, gracias “Joselight”!),

Claudia, Gerard, María Antonia, Neus, Mar (gracias por la ayuda estas últimas semanas) y **Jose** (la portada lleva tu sello, ¡gracias nano!).

Si dentro de mi grupo he conocido a personas increíbles, lo mismo puedo decir del resto de personas que formaron o todavía forman parte de otros grupos del departamento. **Emma**, podría darte las gracias de un millón de maneras posibles pero me quedaría corto. Me has ayudado en tantos temas (¡es lo que tiene saber de todo!) que te mereces una ola. **David**, mi compadre, “el tira-falcons”, aunque me debas una merienda, tienes un corazón más grande que el castillo de Monzón. **Luisa**, ¡qué orgullo de Doctora! Un ejemplo de superación y lucha. Grande. ¡Muito obrigado por todo! **Sergi**, company, mejor persona que runner (¡y ya es decir!). **Laia**, la sonrisa del departamento. Mis C_2C_{12} me preguntan por ti. Gracias por presentármelas. Igual de importantes en esta tesis han sido **Lucía, Saray, Caro, Ana, Aurelio, David Álvarez, Miren, Raúl, Jose** (siempre con nosotros), **Mario, Alberto, Sonia, Gaia, Carla, Pol, Gonzalo, Nacho, Dimitri, Christian, Andrés, Vero, Eileen, Paolo** (fenómeno, ¡grazie mille amico mio!), **Susanna, Alexia, Alba, Oriol, Francesc, Álvaro, Mohammed...** y al resto de compañeros del laboratorio por su apoyo diario. Espero no haberme dejado a ninguno. Y si es así, que me lo diga y lo arreglamos entre cervezas.

Repasando una vez más todos los nombres, y con la piel de gallina por tanta emoción, pienso que lo mejor de todo es, sin duda, que el adjetivo compañero se queda corto. Gracias AMIGOS. Entre todos habéis conseguido que cada mañana entrase en el laboratorio con una sonrisa, y que al final del día saliese de él con una todavía más grande. Gracias por todos los momentos, las quedadas, las risas, las cursas y los entrenos, las birras, las comidas en el aula 3... Mil gracias.

Tampoco puedo olvidarme de toda la ayuda prestada a nivel técnico-administrativo por **Mar** y **Silvia**, y por el personal del estabulario. Gracias a ellos también, así como al resto de profesores del departamento que alguna vez me ayudaron.

Gracias también a quienes, durante un curso, fueron mis compañeros en la sexta planta del Hospital Clínico mientras realizaba mi máster. No sé si algún día llegareis a leer estas líneas, pero quiero acordarme de vosotros. En especial de **Unai, Leo, Cedric, Xevi, Isaac** y **Jesús**. Y de **Esther** Pozas, por su dirección en dicho máster. Gracias a todos.

Rebobinando un poco más en el tiempo, llegamos a mis años en Biología. Allí empezó todo, y aunque haya llovido mucho desde entonces, no puedo olvidarme de la gente tan increíble que conocí. Fue un orgullo para mí ser capitán de un equipo tan legendario como los Biolokos. Acabamos la carrera, pero el equipo sigue igual de unido, y eso no tiene precio. **Juan, Raúl, Masfi, Sergio, Araña, Esteve, Antoñito, Edu...** No tengo palabras para definiros. Sois muy importantes para mí. Gracias por estar siempre ahí. Gracias por todo el caíño. Y dentro de esas mismas aulas, también tuve la suerte de coincidir con dos mañicas geniales que me alegraron el día a día. **Ari, Carmenica**, esta tesis también va por vosotras. ¡Equipo maravilla al poder!

También quiero dedicar esta tesis a mis queridos Ponchitos. Si pudiera traerme algo de Monzón, sería sin duda, a vosotros. Los amigos más fieles, lo mejor de Aragón! Gracias a (vamos allá!): **Anabel, Chiruko, Cortés, Desi, Eli, Isaac, Jony, Laura, López, Lucía, Luigi, María P., María S., Ortega, Pepe, Raquel, Tamara y Toni.** Gracias por tanto ánimo. Por fin ha llegado el momento de celebrarlo!

Y pasamos a la familia. Ese momento en el que los agradecimientos se quedan cortos. Ese momento en el que te das cuenta de que sólo hay algo en la vida que no se elige, y es la familia que te toca. Pues yo puedo decir que a mí me ha tocado el gordo. Familia Baena y familia Muñoz. Sois los mejores. Gracias por todo. Por todo el interés y todas las palabras de ánimo. Gracias en especial a esa parte de mi familia, la catalana, por acogerme en Barcelona hace casi 12 años, y tratarme de una manera inmejorable. **Berta, Enric, Laia, Sandra, Víctor, Sergio, Cristina, Carmen, Pedro, María Rosa, Pili, Antonio, Giorgio...** Gracias por hacerme sentir mejor que en casa. Os quiero mucho.

Una de las cosas que se eligen a lo largo de la vida, es la persona con la que deseas compartir tus días. **Marta**, mi niña, llevas a mi lado desde hace casi 8 años, por lo que esta tesis también es tuya. En todo ese tiempo me has enseñado y me has hecho sentir cosas maravillosas. Gracias por estar a mi lado siempre. Gracias por apoyarme y por ser como eres. Te quiero mucho cariño.

Mamá, Papá, a vosotros os debo todo. Os debo todo lo que soy, todo lo que tengo, y todo lo que he conseguido en esta vida. Es absurdo intentar explicar a estas alturas lo orgulloso que estoy de vosotros. Soy consciente de todo lo que habéis luchado para que yo pueda conseguir este sueño, un sueño que también es vuestro. Disfrutadlo también. Os lo habéis ganado. Os quiero.

Y las últimas palabras que escribo de esta tesis tienen un significado muy especial. Son para dos personas que durante 12 años lo han dado todo por mí. Dos personas sin las cuales, no sólo la tesis, sino incluso ya la carrera de Biología, hubiese sido imposible. Los mejores compañeros de piso posible. **Tiet**, gracias por toda la ayuda, por tratarme como a un hijo, y por hacer todo lo posible para que nunca me faltase de nada. Gracias por estar siempre pendiente de mí. Y **yaya...** para ti va esta tesis. Para ti en especial. Nadie me ha tratado tan bien como tú todo este tiempo. Nadie como tú se ha preocupado tanto por mí. Nadie como tú.... Os quiero muchísimo a los dos.

*"Y esta palabra, este papel, escrito por las mil manos de una sola mano, no queda en mí ni en vosotros, ni tampoco sirve para sueños. Cae a la tierra, y allí se continúa, pero no como mera palabra en papel escrito, sino como una sucesión de sonidos del corazón. Llamadlo música si queréis. Y cuando la música se termina, los músicos nos miramos como si estuviésemos desnudos, y ahí decidimos si merece la pena seguir tocando, o si sólo fuimos meros objetos del infinito equilibrio universal de los planetas. **Hasta siempre.**" (Kutxi Romero)*

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	VII
I. PRESENTACIÓN	1
II. INTRODUCCIÓN TEÓRICA	5
1) FRUCTOSA	7
1.1. Uso de la fructosa como edulcorante.....	7
1.2. Propiedades dietéticas de la fructosa: Uso en pacientes diabéticos.....	9
1.3. Consumo de fructosa y estudio en humanos.....	10
1.3.1. Fructosa y síndrome metabólico.....	14
1.3.2. Fructosa y esteatosis hepática no alcohólica.....	16
1.4. Metabolismo de la fructosa: diferencias con respecto a la glucosa.....	18
1.5. La rata como modelo experimental: Estudios previos.....	21
2) INSULINA Y METABOLISMO DE LA GLUCOSA	23
2.1. Insulina y transportadores de carbohidratos.....	24
2.2. Vía de señalización de la insulina.....	24
2.2.1. Receptor de insulina y sustrato del receptor de insulina.....	24
2.2.2. Vía de señalización PI3K-Akt.....	25
2.2.2.a. Activación de Akt en hígado:	
Importancia del factor de transcripción FoxO1.....	26
2.2.2.b. Activación de Akt en músculo esquelético:	
Importancia de GLUT4 y AS160.....	28
2.2.2.c. Activación de Akt en tejido adiposo:	
Efecto sobre la lipogénesis y la lipólisis.....	30
2.2.3. MAPKs y su papel en el metabolismo energético.....	31
2.3. Inhibición de la vía de la insulina: Resistencia a la insulina.....	33
2.3.1. Resistencia a la insulina inducida por microRNAs:	
Papel de miRNA-33a/b.....	34
3) SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS: LIPOGÉNESIS	36
3.1. Regulación génica de la lipogénesis.....	38
3.1.1. Factor de transcripción ChREBP.....	39
3.1.2. Factor de transcripción SREBP-1c.....	40

4) OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS: β -OXIDACIÓN	42
4.1. Regulación transcripcional de la β -oxidación: PPAR α	43
4.2. Regulación alostérica de la β -oxidación	45
4.3. Otros mecanismos reguladores de la β -oxidación	46
4.3.1. HNF4 y metabolismo lipídico	46
4.3.2. FGF21: Regulación metabólica en ayunas	46
4.3.3. Conexión Sirt1 – PGC1 α	47
4.4. β -oxidación en el músculo esquelético: Papel de GPR119	48
5) ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO	49
5.1. XBP1 y su papel en la lipogénesis hepática	51
5.2. Estrés de retículo y su relación con las proteínas SREBP	51
5.3. Estrés de retículo e inflamación	52
5.4. Estrés de retículo y gluconeogénesis	53
6) AUTOFAGIA Y SU PAPEL EN LAS ALTERACIONES METABÓLICAS	54
6.1. Papel de mTOR	55
6.2. Autofagia y Sirt1	59
7) FRUCTOSA Y ATEROESCLEROSIS	60
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	67
1) ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	69
1.1. Diseño del estudio	69
1.2. Test de tolerancia a la glucosa y curva de insulina	70
2) DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PLASMÁTICOS	71
2.1. Análisis de las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol	71
2.2. Obtención de plasma	71
2.3. Análisis de ácido úrico	71
2.4. Análisis de endotoxinas	71
2.5. Análisis de ácidos grasos no esterificados	72
2.6. Fraccionamiento de las lipoproteínas plasmáticas: FPLC	72
2.7. Análisis de las concentraciones de insulina, adiponectina, leptina y FGF21	72

3) ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS HEPÁTICOS Y MUSCULARES.....	73
3.1. Niveles de triglicéridos totales en hígado y en tejido muscular.....	73
3.2. Composición de ácidos grasos en hígado. Actividad SCD1.....	74
4) DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPÁTICA DE β -OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS.....	74
4.1. Obtención del sobrenadante postnuclear.....	74
4.2. Ensayo de β -oxidación.....	75
5) VALORACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL HÍGADO.....	75
5.1. Tinción con hematoxilina y eosina.....	76
5.2. Tinción tricrómica de Masson.....	76
5.3. Tinción con Oil Red O.....	76
6) DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE mRNA.....	77
6.1. Obtención de RNA total.....	77
6.1.1. Aislamiento a partir de tejido hepático.....	77
6.1.2. Aislamiento a partir de tejido muscular.....	77
6.1.3. Aislamiento a partir de tejido adiposo.....	78
6.1.4. Cuantificación.....	78
6.1.5. Integridad del RNA.....	78
6.2. Reacción de retrotranscripción.....	79
6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	79
6.3.1. Real Time PCR.....	80
6.3.2. Visualización del producto de PCR por tinción con bromuro de etidio.....	82
6.4. Detección de los niveles de miR33.....	82
7) INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	83
7.1. Obtención de extractos totales.....	83
7.1.1. Aislamiento a partir de tejido hepático y muscular.....	83
7.1.2. Aislamiento a partir de tejido adiposo.....	84
7.2. Obtención de extractos nucleares a partir de tejido hepático y muscular.....	84
7.3. Determinación de la concentración de proteína: Método de Bradford.....	85
7.4. Ensayo de Western Blot.....	85
7.4.1. Electroforesis.....	86
7.4.2. Transferencia.....	87

7.4.3. Inmunodetección	87
7.5. Análisis del grado de interacción entre dos proteínas:	
Técnica de co-inmunoprecipitación	89
8) CULTIVO CELULAR: Células C ₂ C ₁₂	90
8.1. Condiciones de mantenimiento del cultivo celular	90
8.2. Congelación	91
8.3. Descongelación	91
8.4. Diferenciación	91
8.5. Tratamiento	92
8.5.1. Tratamiento con fructosa 25 mM 48 horas	92
8.5.2. Tratamiento con fructosa 25 mM 6 horas	92
8.6. Obtención de muestras a partir de cultivo celular	93
8.6.1. Aislamiento de RNA a partir de cultivo celular	93
8.6.2. Aislamiento de proteína total a partir de cultivo celular	93
9) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	94
V. RESULTADOS	95
1) SUPLEMENTACIÓN CON UN 10% (P/V) DE FRUCTOSA EN EL AGUA DE BEBIDA DE LA DIETA DE RATA SPRAGUE-DAWLEY HEMBRA DURANTE 56 DÍAS. DATOS ZOOMÉTRICOS Y ANALÍTICA PLASMÁTICA	97
1.1. El consumo de fructosa provoca un incremento de la ingesta energética, aumentando el peso de los animales	97
1.2. El consumo de fructosa induce hipertrigliceridemia y uricidemia; así como un incremento en los niveles plasmáticos de insulina y leptina	98
2) EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON UN 10% (P/V) DE FRUCTOSA EN EL AGUA DE BEBIDA DE LA DIETA DE RATA SPRAGUE-DAWLEY HEMBRA DURANTE 56 DÍAS SOBRE EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS	100
2.1. Efectos sobre el hígado	100
2.1.1. El consumo de fructosa induce su propio metabolismo	100
2.1.2. El consumo de fructosa causa esteatosis hepática, aumentando el contenido de triglicéridos en este tejido	101
2.1.3. El consumo de fructosa aumenta la expresión de los genes implicados en la lipogénesis hepática	103

2.1.4. El consumo de fructosa disminuye la actividad de β -oxidación de ácidos grasos en hígado, sin modificar los niveles de PPAR α y genes asociados	106
2.2. Efectos sobre el tejido muscular esquelético	109
2.3. Efectos sobre el tejido adiposo	111
3) EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON UN 10% (P/V) DE FRUCTOSA EN EL AGUA DE BEBIDA DE LA DIETA DE RATA SPRAGUE-DAWLEY HEMBRA DURANTE 56 DÍAS SOBRE LA VÍA DEL ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO, INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO	112
3.1. El consumo de fructosa causa una activación “atípica” de la vía del estrés de retículo	112
3.2. El consumo de fructosa no produce inflamación, fibrosis o necrosis en hígado	116
3.3. El consumo de fructosa no produce estrés oxidativo en hígado y tampoco en tejido adiposo	122
4) EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON UN 10% (P/V) DE FRUCTOSA EN EL AGUA DE BEBIDA DE LA DIETA DE RATA SPRAGUE-DAWLEY HEMBRA DURANTE 56 DÍAS SOBRE LA AUTOFAGIA HEPÁTICA	123
4.1. El consumo de fructosa provoca una activación hepática de mTOR, dependiente de TSC1/2	123
4.2. El consumo de fructosa provoca un descenso en la actividad autofágica hepática	126
5) EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON UN 10% (P/V) DE FRUCTOSA EN EL AGUA DE BEBIDA DE LA DIETA DE RATA SPRAGUE-DAWLEY HEMBRA DURANTE 56 DÍAS SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA A NIVEL HEPÁTICO	129
5.1. El consumo de fructosa produce una disminución de la sensibilidad a la insulina en hígado	129
5.2. El consumo de fructosa produce una disminución en la vía de señalización Akt/PI3K en hígado	129
5.3. El consumo de fructosa produce una reducción en la gluconeogénesis hepática dependiente de la inactivación de FoxO1	132

6) LA SUPLEMENTACIÓN CON FRUCTOSA EN CONDICIONES ISOCALÓRICAS CON GLUCOSA INHIBE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN SUS ÓRGANOS DIANA	137
6.1. Tanto el consumo de fructosa como el de glucosa provocan un incremento en la ingesta energética sin aumentar el peso de los animales	138
6.2. Tanto el consumo de fructosa como el de glucosa inducen hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia, pero únicamente el primero afecta a la curva de glucemia tras un test de tolerancia a la glucosa	139
6.3. El consumo de fructosa, pero no el de glucosa, inhibe la vía de señalización de insulina en el hígado	142
6.4. El consumo de fructosa, pero no el de glucosa, disminuye la fosforilación de AS160 en el tejido muscular esquelético	148
6.4.1. Efecto del tratamiento con fructosa en células C ₂ C ₁₂	151
6.5. El consumo de fructosa, pero no el de glucosa, inhibe la vía de señalización de insulina y disminuye la lipólisis en el tejido adiposo	153
VI. DISCUSIÓN	155
1) Efectos de la fructosa sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos	158
2) Efectos de la fructosa sobre el estrés de retículo, inflamación y estrés oxidativo	165
3) Efectos de la fructosa sobre la vía de la autofagia	169
4) Efectos de la fructosa sobre la vía de señalización de la insulina	173
5) Otras consideraciones: Efecto de las horas de ayuno sobre algunos marcadores de interés	179
VII. CONCLUSIONES	181
VIII. BIBLIOGRAFÍA	185
IX. ANEXO: PUBLICACIONES	209
1) <i>Liquid fructose down-regulates liver insulin receptor substrate 2 and gluconeogenic enzymes by modifying nutrient sensing factors in rats</i>	211
2) <i>Liquid fructose downregulates Sirt1 expression and activity and impairs the oxidation of fatty acids in rat and human liver cells</i>	221
3) <i>Fructose supplementation impairs rat liver autophagy through mTORC activation without inducing endoplasmic reticulum stress</i>	233

ABREVIATURAS

11 β -HSD1: *11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1*

4E-BP1: *eIF4E binding protein*

AC: *adenylate cyclase*

ACAD: *acyl-CoA dehydrogenase*

ACC: *acetyl-CoA carboxylase*

ACO: *acyl-CoA oxidase*

ACS: *acyl-CoA synthetase*

ACL: *ATP cytrate lyase*

Akt: *Protein kinase B (PKB)*

AMP: *Adenosine monophosphate*

cAMP: *cyclic AMP*

AMPK α : *5' AMP-Activated protein kinase*

APRT: *Adenine phosphoribosyltransferase*

AS160: *Akt substrate of 160 kDa*

ATF4: *Activating transcription factor 4*

ATF6: *Activating transcription factor 6*

ATG: *Autophagy-related gene*

ATGL: *Adipose triglyceride lipase*

ATP: *Adenosine triphosphate*

AUC: *Área bajo la curva*

bHLH-LZ: *Basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper*

BSA: *Bovine serum albumin*

ChREBP: *Carbohydrate responsive element binding protein*

CHOP: *transcription factor C/EBP homologous protein*

ChoRE: *Carbohydrate responsive element*

Coll α 1: *Collagenase-1*

CPT1/2: *Carnitine palmitoyltransferase1/2*

c.s.: *cantidad suficiente*

CT: *Carnitine translocase*

CYP4A: *Cytochrome P-450 (CYP) Omega-Hydroxylase*

DEPC: *Dietilpirocarbonato*

DAG: *Diacylglycerol*

DGAT: *Diacylglycerol acyltransferase*

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

cDNA: *complementary DNA*

DNAJB9: *DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9*

DNL: *de novo lipogenesis*

DTT: *Dithiothreitol*

EDEM1: *ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EGTA: *Ethylene glycol tetraacetic acid*

eIF2 α : *Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*

eIF4E: *Eukaryotic translation initiation factor 4E*

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

Erk1/2: *Extracellular signal-regulated kinase*

FABP: *Fatty acid binding protein*

FAD: *Flavin adenine dinucleotide*

FAT: *Fatty acid transporter*

FAS: *Fatty acid synthase*

FFAs: *Free fatty acids*

FGF21: *Fibroblast growth factor 21*

FK: *Fructokinase*

FoxO1: *Forkhead box protein O1*

FPLC: *Fast Protein Liquid Chromatography*

G6Pc: *Glucose 6-phosphatase, catalytic subunity*

G6PDH: *glucose-6-phosphate dehydrogenase*

GADD34: *Growth arrest and DNA damage-inducible 34*

GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GK: *Glucokinase*

GLUT: *Glucose transporter*

GPAT: *Glycerol-3-phosphate acyl transferase*

GPR119: *G-protein-coupled receptor 119*

GPR78: *G-protein-coupled receptor 78*

GPX1: *Glutathione peroxidase 1*

GRP94: *Glucose-regulated protein 94*

GS: *Glycogen synthase*

GSK3 β : *Glycogen synthase kinase 3 beta*

HCDH: *Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase*

HDL: *High density lipoprotein*

HFCS: *High fructose corn syrup*

HMGCS: *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Synthase*

HMGCR: *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase*

HNF4: *Hepatocyte nuclear factor 4*

HSL: *Hormone-sensitive lipase*

IG: *Índice Glucémico*

I κ B: *Inhibitor of kappa B*

IR: *Insulin receptor*

IRE: *Insulin-responsive element*

IRE1: *Inositol requiring enzyme 1*

IRS: *Insulin receptor substrate*

ISI: *Índice de Sensibilidad a la Insulina*

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

Lamp1: *Lysosomal-associated membrane protein-1*

LC3: *microtubule-associated protein light chain 3*

LD: *Lipid droplets*

LDH: *Lactate dehydrogenase*

LDL: *Low density lipoprotein*

LPK: *Liver pyruvate kinase*

LPL: *Lipoprotein lipase*

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

MCD: *Malonyl-CoA decarboxylase*

MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein-1*

miRNA: *micro-RNA*

MKP-3: *MAPK phosphatase 3*

mLST8: *mammalian lethal with SEC13 protein 8*

mt-co1: *mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I*

MT-1/2: *Metallothionein-1/2*

mTOR: *mammalian Target Of Rapamycin*

mTORC: *mTOR Complex*

Myd88: *Myeloid differentiation factor 88*

MUFAs: *Monounsaturated fatty acids*

Nappi: *sodium pyrophosphate*

NAD: *Nicotinamide adenine dinucleotide*

NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NAFLD: *esteatosis hepática no alcohólica (non-alcoholic Fatty Liver Disease)*

NAM: *Nicotinamide*

NAMPT: *Nicotinamide phosphoribosyltransferase*

NASH: *esteatohepatitis no alcohólica (non-Alcoholic Steatohepatitis)*

NEFAs: *Nonesterified fatty acids*

NFκB: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NLRP3: *pyrin domain containing 3*

NRF2: *Nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related Factor 2*

Pai-1: *Plasminogen activator inhibitor-1*

PCR: *Reacción en cadena de la polimerasa*

PDE3B: *Phosphodiesterase 3*

PDH: *Pyruvate dehydrogenase*

PK1: *3'-phosphoinositide-dependent kinase 1*

PK4: *Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4*

PERK: *Protein kinase-like endoplasmatic reticulum kinase*

PEPCK: *Phosphoenolpyruvate carboxykinase*

PGC1α: *Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1*

PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase*

PIP2: *Phosphatidylinositol biphosphate*

PIP3: *Phosphatidylinositol triphosphate*

PKA: *Protein kinase A*

PKC: *Protein kinase C*

PMSF: *Phenylmethanesulfonylfluoride*

PP2A: *Protein phosphatase 2*

PPAR: *Peroxisome proliferator-activated receptor*

PPRE: *Peroxisome proliferator response element*

PMRT1: *Protein arginine N-methyltransferase 1*

PTB: *Phosphotyrosine binding module*

PTEN: *Phosphatase and tensine homologue*

PTP1B: *Protein phosphatase 1B*

PUFAs: *Polyunsaturated fatty acids*

QM: *Quilomicrones*

RAPTOR: *Regulatory-associated protein of mTOR*

RE: *Retículo endoplasmático*

Rheb: *Ras homolog enriched in brain*

RIA: *Radioinmunoensayo*

ROS: *Reactive oxygen species*

RNA: *Ribonucleic acid*

mRNA: *messenger RNA*

RUVBL1/2: *RuvB-like 1/2*

rpS18: *40S ribosomal protein S18*

rpS6: *ribosomal protein S6*

RXR: *Retinoid X Receptor*

S6K: *S6 kinase*

SAT: *Tejido adiposo subcutáneo*

SCD1: *stearoyl-CoA desaturase 1 (delta-9-desaturase)*

SDS: *Sodium dodecyl sulfate*

SFAs: *Saturated fatty acids*

SEC61α1: *Sec61 alpha 1 subunit*

SGK1: *Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1*

SIK2: *Salt-inducible kinase 2*

SIRT1: *Silent information regulator 1*

SM: *Síndrome Metabólico*

SOCS: *Supressors of citokine signaling*

SOD2: *Superoxide dismutase 2*

SPT: *Serine palmitoyltransferase*

SRE: *SREBP response element*

SREBP-1: *Sterol regulatory element-binding protein 1*

TAG: Triglicéridos

TBP: *TATA-binding protein*

TELO2: *Telomere maintenance 2*

TEMED: *Tetramethylethylenediamine*

TLR-4: *Toll-Like receptor 4*

TNF α : *Tumor necrosis factor alpha*

TSA: *Trichostatin A*

TSC1/2: *Tuberous sclerosis complex 1/2*

ULK1: *Uncoordinated 51-like kinase 1*

UPR: *Unfolded protein response*

VAT: Tejido adiposo visceral

VLDL: *Very low density lipoprotein*

XBP1: *X-Box binding protein 1*

I. PRESENTACIÓN

En las últimas décadas se ha observado un aumento muy notable de la prevalencia de enfermedades metabólicas como la obesidad, el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina. Por ejemplo, en Estados Unidos, casi tres cuartas partes de la población adulta presentan sobrepeso u obesidad. De éstos, casi una tercera parte padecen el síndrome metabólico. En España, un estudio de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) realizado en el año 2000, muestra una prevalencia de la obesidad del 14.5% entre individuos de 25 a 60 años (Aranceta y col., 2003). Por otro lado, la prevalencia mundial estimada para la diabetes en la población adulta era de un 6.4% en el año 2010 y se prevé que este porcentaje aumente hasta un 7.7% en el año 2030, constituyendo la diabetes mellitus de tipo 2 el 90% de los casos (Nolan y col., 2011).

Los malos hábitos alimenticios, así como un estilo de vida sedentario, son factores que promueven la aparición de todas estas alteraciones (Johnson y col., 2007). En los últimos años se ha observado un incremento por parte de la población en la ingesta calórica total, a la vez que se ha producido un cambio en la proporción en la que algunos nutrientes forman parte de la dieta humana. En este aspecto, cabe destacar el aumento en el consumo de fructosa debido, principalmente, a su utilización como edulcorante en bebidas refrescantes (Elliot y col., 2002; Lim y col., 2010). De hecho, son muchos los estudios que relacionan este aumento en el consumo de fructosa con la aparición de enfermedades metabólicas (Gross y col., 2004; Welsh y col., 2010).

Debido a que la administración de fructosa en ratas produce unos desequilibrios metabólicos similares a los que sufren los humanos con síndrome metabólico, se ha aceptado a la rata alimentada con fructosa como un buen modelo para el estudio de este síndrome (Nagai y col., 2002).

Mediante este modelo experimental, nuestro grupo de investigación demostró cómo la administración de fructosa al 10% (peso/volumen, p/v) en el agua de bebida en ratas Sprague-Dawley durante 14 días provocaba una serie de alteraciones metabólicas, entre las que se incluyen esteatosis hepática, hipertrigliceridemia, hiperleptinemia, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (Roglans y col., 2007; Vilà y col., 2008; Rebollo y col., 2014b).

En el presente trabajo se ha profundizado en el estudio de estas alteraciones metabólicas inducidas por una ingesta de fructosa, así como los mecanismos moleculares implicados. Se ha valorado, además, el efecto que una suplementación de fructosa puede producir sobre otras vías de interés, como son el estrés de retículo endoplasmático, la inflamación o la autofagia hepática. Mediante un estudio comparativo entre una ingesta de fructosa y una de glucosa, se ha analizado el efecto exclusivo que presenta el consumo de fructosa sobre la aparición de dichas alteraciones metabólicas.

II. INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1) FRUCTOSA

La fructosa, también conocida como levulosa, es un monosacárido con forma empírica $C_6H_{12}O_6$ que se encuentra de forma natural en la miel y en la fruta. Además, la fructosa es un componente del disacárido sacarosa (conocido comúnmente como azúcar de mesa) que proviene principalmente de la caña de azúcar y en el cual una molécula de fructosa se encuentra unida a una molécula de glucosa.

En los últimos años, se ha observado un incremento notable en el uso de la fructosa como sustancia edulcorante en muchos alimentos de nuestra dieta, provocando no sólo un aumento en la ingesta de calorías provenientes de este azúcar, sino también un aumento en el número total de calorías ingeridas. Este fenómeno se ha relacionado con un incremento en la aparición de enfermedades como obesidad, dislipemia, hígado graso y diabetes mellitus tipo 2, entre otras (Gross y col., 2004; Welsh y col., 2010).

1.1) Uso de la fructosa como edulcorante

Al igual que la sacarosa, la fructosa se encuentra dentro del grupo de edulcorantes nutritivos reconocidos por la FDA (*Food and Drug Administration*). Antes de la época industrializada era poco factible desde un punto de vista económico la producción de fructosa y el principal edulcorante que se utilizaba era el azúcar común (sacarosa), obtenido a partir de la caña de azúcar o de la remolacha, que se utilizaba principalmente como edulcorante del té y del café, así como para la producción de dulces y productos de pastelería.

De esta forma, la sacarosa se mantuvo como edulcorante prácticamente exclusivo hasta principios de la década de los 70, cuando se empezó a introducir en la industria alimentaria un nuevo edulcorante conocido como *High Fructose Corn Syrup* (jarabe de maíz enriquecido con fructosa, HFCS de sus siglas en inglés). Este avance provocó a partir de entonces la presencia de fructosa en productos tales como cereales, postres, zumos, bebidas carbonatadas y refrescos gaseosos. El HFCS se elabora a partir de almidón de maíz, el cual es hidrolizado enzimáticamente hasta obtener moléculas de glucosa libre que, posteriormente, son convertidas a moléculas de fructosa mediante la acción del enzima glucosa isomerasa. Gracias a esta técnica se pueden obtener diferentes HFCS en función del porcentaje de fructosa presente en el producto final, siendo los más comunes el HFCS-42 y el HFCS-55, que contienen un 42% y un 55% de fructosa respectivamente, y donde el porcentaje restante corresponde a glucosa y, en menor medida, a otros azúcares como maltosa, maltotriosa o maltotetraosa (White y col., 2015).

En 1970, el HFCS representaba menos de un 1% del total de calorías ingeridas a partir de bebidas edulcoradas en Estados Unidos, pero este porcentaje aumentó rápidamente con el paso del tiempo y en el 2000 alcanzó el 42%. En los primeros años de elaboración el HFCS más utilizado fue el HFCS-42, pero a partir de la década de los 80 el HFCS-55 adquiere un mayor

II. INTRODUCCIÓN TEÓRICA

protagonismo, hasta llegar a constituir el 61% de todos los HFCS presentes en el mercado en el año 2000 (Bray y col., 2004).

En la actualidad, el HFCS ha reemplazado a la sacarosa en muchos alimentos y bebidas debido a su gran poder edulcorante, bajo coste, propiedades funcionales y estabilidad (figura II-1). De esta manera, el HFCS se ha convertido en el principal edulcorante utilizado en la industria de bebidas (Tappy y Lê, 2010; Johnson y col., 2009).

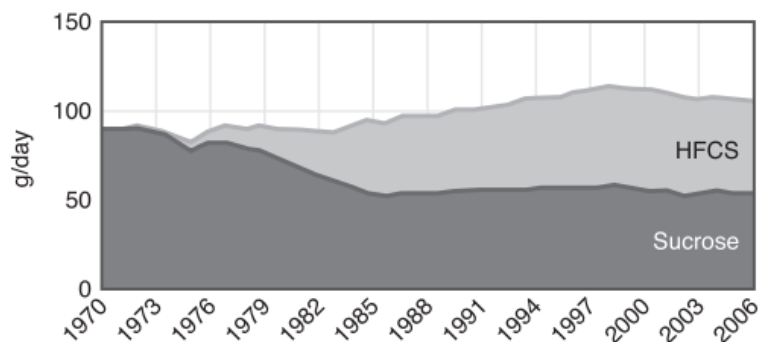


Figura II-1. Evolución del consumo de sacarosa y HFCS en los Estados Unidos (Tappy y Lê, 2010).

En las últimas décadas el consumo de fructosa ha aumentado considerablemente como consecuencia, principalmente, del incremento en la ingesta de bebidas edulcoradas. Mientras una persona puede consumir de 16 a 20 gramos de fructosa por día proveniente de fruta fresca, el uso de fructosa como aditivo o edulcorante ha llegado a incrementar el consumo de esta sustancia hasta aproximadamente 85-100 gramos diarios (Basciano y col., 2005).

Se estima que el consumo medio por persona en el año 1986 era de 56 g fructosa/día y que ha aumentado progresivamente hasta llegar a los 65 g/día en el año 2007 (Tappy y Lê, 2010). Actualmente, gracias al estudio NHANES 2003-2006 realizado por la “*National Health and Nutrition Examination Survey*”, se sabe que la ingesta media de fructosa por persona en Estados Unidos es de 74 g/día, lo que corresponde a 2.5 bebidas edulcorantes cada día (Jalal y col., 2010). Basados en estudios en los que se ha estimado el consumo de fructosa, algunos investigadores han considerado como consumo excesivo de este monosacárido cuando la ingesta diaria supera los 50 gramos (Hosseini-Esfahani y col., 2011).

Debido a este incremento en el consumo de edulcorantes por parte de la población, en 2010 la “*Dietary Guidelines for Americans*” recomendó a la población americana limitar la ingesta de calorías prescindibles, incluyendo las procedentes tanto de azúcares como de grasas sólidas, a un 5-15% de las calorías totales ingeridas en un día. Sin embargo, estudios recientes en individuos jóvenes de la población muestran cómo en este sector de la población, el 16% de las calorías totales consumidas a diario proviene de azúcares añadidos (Ervin y Ogden, 2013). La población joven es la mayor consumidora de azúcares presentes en alimentos o bebidas, y se estima que en Estados Unidos en uno de cada cuatro niños la ingesta de bebidas azucaradas representa el 25% del total de calorías ingeridas en la dieta (Bray y col., 2004).

Con respecto a la situación en España, gracias al estudio DRECE (*Dieta y Riesgo de Enfermedades Cardiovasculares en España*) de Gutiérrez y colaboradores (2011), que monitoriza los hábitos alimenticios de la población española, a la vez que analiza la evolución de los factores de riesgo cardiovascular, se observó que el consumo medio de azúcar era de unos 26 gramos al día por persona. Gracias a este estudio, se determinó cómo el consumo de bebidas sin alcohol (entre las que se incluyen las bebidas edulcoradas) era de unos 425 ml por persona y día, siendo los individuos más jóvenes (de 20 a 34 años) los principales consumidores de este tipo de bebidas. Se observa además que, a medida que envejece, la población española adopta hábitos alimenticios más saludables, aumentando considerablemente la ingesta de frutas y verduras.

1.2) Propiedades dietéticas de la fructosa: Uso en pacientes diabéticos

Para entender el porqué de este aumento en la utilización de la fructosa por parte de la industria alimentaria, es importante destacar algunas características que hacen de este azúcar el edulcorante idóneo.

Este azúcar, al igual que la glucosa y la sacarosa, contiene un poder calórico de 4 kcal por gramo. Sin embargo, a pesar de presentar el mismo poder calórico que el resto de azúcares, la fructosa destaca por su elevado poder edulcorante. Gracias a estudios comparativos, en los cuales el poder edulcorante de la sacarosa se estableció en 100, se pudo determinar que la fructosa presentaba un poder edulcorante de 173, mientras que la glucosa sólo de 74 (Bray y col., 2004). Teniendo en cuenta estos valores, el HFCS-42 y el HFCS-55 tienen 1.16 y 1.28 veces, respectivamente, más poder edulcorante que la sacarosa. Además, es importante destacar que en el HFCS las moléculas de glucosa y fructosa se encuentran libres en forma de monosacáridos, mientras que en la sacarosa un enlace glucosídico une a los dos monosacáridos (Goran y col., 2013). Este enlace adquiere gran relevancia, ya que proporciona diferencias en la metabolización y en la absorción de las moléculas de fructosa. Se ha observado que la fructosa libre se metaboliza más rápidamente que aquella que forma parte de una molécula de sacarosa. De hecho, hay estudios que demuestran cómo una ingesta de fructosa libre es más perjudicial para el metabolismo que la ingesta de fructosa en forma de sacarosa (Le y col., 2012).

Otro de los aspectos importantes a tener en cuenta para comprender el uso de la fructosa en la industria alimentaria es su bajo índice glucémico (IG). El IG es un parámetro que se utiliza para clasificar a los carbohidratos en función del incremento de la glucemia que se obtiene tras la ingesta de los mismos. Para establecer el IG de un alimento, se realiza un área bajo la curva de la evolución de la glucemia durante las 2 horas posteriores a la ingesta del alimento en estudio (debe ser una cantidad equivalente a 50 gramos de carbohidrato biodisponible). Este área bajo la curva se compara con otro similar obtenido tras la ingesta de 50 g de un producto de referencia (glucosa o pan blanco, a los que se les asigna un IG de 100). El valor del IG del alimento en estudio se obtiene gracias al cociente entre las áreas de las dos curvas de glucemia. De esta manera, los alimentos con un IG elevado serán aquellos que se digieren y se absorben

de forma rápida, provocando un aumento considerable de los niveles de glucosa en plasma; mientras que los alimentos con un IG bajo producirán incrementos más tenues de la glucemia (y por lo tanto, de la insulinemia), además de aumentar la sensación de saciedad. Gracias a esta fórmula y a diversos análisis, se ha determinado que la fructosa presenta un IG bajo (19), mientras que la sacarosa presenta un IG de 68 (Foster-Powell y col., 2002).

Un tercer aspecto relacionado con lo anterior y que hace a la fructosa atractiva como edulcorante es el hecho de que, contrariamente a lo que ocurre tras una ingesta de glucosa, este azúcar no estimula la secreción de insulina tras su consumo y no requiere la presencia de esta hormona en plasma para entrar al interior de los tejidos y ser metabolizada, por lo que los niveles de azúcar en plasma no aumentan tras una ingesta de fructosa (Curry, 1989).

Debido a estas características, durante mucho tiempo se aconsejó la fructosa a pacientes diabéticos, así como para aquellas personas que desearan bebidas edulcoradas más saludables para controlar su dieta, ya que al presentar un poder edulcorante mayor, la fructosa podía proporcionar bebidas dulces a partir de menos azúcar añadido; o lo que es lo mismo, más sensación de dulzor a partir de menos calorías.

Sin embargo, en los últimos años se ha observado cómo la fructosa presenta muchos efectos adversos sobre el metabolismo energético. En la mayoría de las investigaciones realizadas sobre este tema en humanos y animales, donde se analiza el consumo de fructosa, se ha encontrado una asociación significativa entre el consumo de este azúcar y alteraciones de la homeostasis de la glucemia, resistencia a la acción de la insulina y a la leptina, alteraciones del perfil lipídico, con hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, incremento de los ácidos grasos libres e hiperuricemia, así como un incremento de la adiposidad abdominal y del peso corporal (Lê y Tappy, 2006; Stanhope y Havel, 2008; Teff y col., 2009; Hosseini-Esfahani y col., 2011).

Todos estos estudios desaconsejan el uso de la fructosa como edulcorante, sobre todo para personas diabéticas. De hecho, los efectos adversos de la fructosa sobre el perfil de los lípidos plasmáticos condujo a la *American Diabetic Association* a advertir que, contrariamente a lo que se pensaba hasta el momento, no era recomendable el uso de este azúcar como edulcorante en pacientes diabéticos (Franz y col., 2002).

1.3) Consumo de fructosa y estudio en humanos

En humanos sanos la concentración sanguínea de fructosa durante el ayuno no supera el valor de 1 mg/dl (lo que equivale a 0.05 mM), e incrementa proporcionalmente hasta valores de 4.5 a 13 mg/dL (0.225 a 0.650 mM) con un consumo de 18 a 100 g de este azúcar, alcanzando su pico máximo de concentración en plasma a los 30-60 minutos tras la ingesta (Mayes 1993, Gaby y Alan, 2005).

Son varios los estudios realizados hasta la fecha que profundizan en el efecto adverso de la ingesta de fructosa sobre la salud humana. Los primeros de estos estudios analizaban el efecto que producía el consumo de sacarosa en la población. De esta forma, se demostró cómo una dieta suplementada con 200 g de sacarosa al día en una población de jóvenes adultos provocaba un incremento en los niveles de triglicéridos plasmáticos, algo que no ocurría cuando el carbohidrato añadido era el almidón (Johnson y col., 2007). En otro estudio, la administración de suplementos de sacarosa resultó en una ganancia de peso de los individuos y en un incremento de los triglicéridos plasmáticos y de la presión sistólica (Raben y col., 2002). Otros estudios han demostrado cómo dietas enriquecidas con sacarosa o fructosa producen resistencia a la insulina (Faeh y col., 2005), aunque cabe destacar que en estas dietas los azúcares proporcionan unas 400-800 kcal por día, lo que sitúa este consumo en el límite superior del consumo actual en los Estados Unidos.

Una vez analizados los efectos adversos sobre la salud provocados por la ingesta de sacarosa, los estudios se centraron en determinar si existía alguna diferencia entre el consumo de fructosa y el de glucosa. De esta forma, surgieron estudios comparativos entre los dos azúcares. Teff y colaboradores (2004) demostraron que el consumo de fructosa líquida (30% de la ingesta calórica total) incrementaba la concentración de triglicéridos postprandiales en plasma, en comparación con el consumo de la misma cantidad de glucosa. Un estudio más reciente (Stanhope y col., 2009) demostró que la ingesta de fructosa líquida (25% de la energía total) durante 10 semanas provocaba un aumento de la lipogénesis en el hígado, a la vez que promueve la aparición de dislipemia y disminuye la sensibilidad a la insulina en individuos con sobrepeso u obesidad. Por el contrario, no se observaron ninguno de estos efectos cuando los individuos consumieron glucosa líquida en la misma proporción.

Se ha observado cómo el efecto negativo de la fructosa sobre la homeostasis de los lípidos es debido a la acción que este azúcar provoca sobre dos vías importantes en el metabolismo de los lípidos a nivel hepático: la inhibición de la beta-oxidación de los ácidos grasos y la estimulación de la lipogénesis *de novo* de los mismos (Stanhope y Havel, 2010).

Abdel-Sayed y colaboradores (2008) demostraron que una dieta rica en fructosa líquida (3 g/Kg masa corporal y día, comparable a una ingesta de 2-3 litros de bebidas azucaradas diaria) era capaz de provocar una disminución de la oxidación lipídica en comparación con una dieta control, lo que provocaba un aumento de las concentraciones de triglicéridos en plasma. Otro estudio muy similar demostró, además, cómo un consumo de fructosa (correspondiente al 25% de la ingesta calórica total) durante un periodo de 6 días provocaba disminución de la oxidación lipídica en hombres, pero no así en mujeres (Couchepin y col., 2008).

Algunos estudios muestran cómo el consumo de fructosa, pero no así el de glucosa, es capaz de provocar un incremento de la lipogénesis *de novo* en humanos (Stanhope y col., 2009). A partir de este estudio se planteó la posibilidad de que la alteración metabólica más temprana causada por el consumo elevado de fructosa fuera una hipertrigliceridemia postprandial. Sin embargo, la fructosa no sólo es capaz de aumentar el contenido de lípidos en el hígado mediante la

II. INTRODUCCIÓN TEÓRICA

lipogénesis a partir de fuentes endógenas, sino que también es la responsable del aumento de los lípidos hepáticos al incrementar la susceptibilidad del hígado de captar ácidos grasos de la circulación (Stanhope y col., 2009).

Este aumento en la lipogénesis hepática tras el consumo de fructosa tiene como resultado otro efecto adverso sobre la salud, ya que provoca la síntesis de la variante 1 de las VLDL (*very low density lipoprotein*). Este tipo de lipoproteína se caracteriza por tener un gran tamaño con un gran contenido en ácidos grasos y es capaz de originar una LDL (*low density lipoprotein*) con mayor capacidad aterogénica (Liu y col., 2012). Además, la presencia de hipertrigliceridemia potencia una mayor entrada de ácidos grasos a tejidos periféricos como músculo y tejido adiposo a partir de los triglicéridos de las VLDL, favoreciendo así la formación de adiposidad visceral (Dekker y col., 2010). En este último aspecto, Stanhope y Havel (2010) demostraron cómo una ingesta de fructosa en forma de bebida (25% de la energía total ingerida) durante 10 semanas provocaba en los sujetos un aumento del tejido adiposo visceral (VAT); mientras que el mismo consumo a partir de glucosa incrementaba el tejido adiposo subcutáneo (SAT). Es importante destacar que son varios los estudios que encuentran una relación más estrecha entre el VAT y la aparición de la diabetes tipo 2 y de las enfermedades cardiovasculares y metabólicas, en comparación con el SAT (Jensen, 2008). Además, es importante destacar que el VAT es una herramienta muy útil a la hora de diagnosticar al paciente, ya que condiciona el perímetro a nivel de cintura (adiposidad abdominal), uno de los parámetros a valorar a la hora de diagnosticar el síndrome metabólico, y que se explicará con más detalle a continuación.

Con respecto a los efectos perjudiciales que presenta la fructosa sobre el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina, se ha observado que el consumo de 3g/kg/día de fructosa incrementa la ingesta calórica total en un 25%, produciendo síntomas de resistencia a la insulina en el hígado y en el tejido adiposo en apenas 6 días en individuos sanos (Gaby, 2005). Además, otro estudio demostró cómo la ingesta aguda de fructosa en individuos sanos induce resistencia a la insulina, tanto a nivel hepático como extrahepático (Dirlewanger y col., 2000). Lê y Tappy (2006) también demostraron cómo una ingesta de fructosa era capaz de provocar cambios en el músculo esquelético, como por ejemplo una disminución en la expresión del transportador de glucosa para este tejido, fenómeno que puede ser considerado como un marcador temprano de resistencia a insulina en el músculo esquelético.

Además del efecto sobre la insulina, es importante destacar el papel que ejerce la fructosa sobre otra hormona con gran importancia a nivel del sistema nervioso central en el balance energético: la leptina. Esta hormona se sintetiza principalmente en el tejido adiposo como respuesta a una hiperinsulinemia. Su función es la de inhibir la ingesta calórica al provocar una sensación de saciedad en el individuo, a la vez que incrementa el gasto energético. Se ha descrito cómo tras una ingesta de glucosa, se produce un aumento de la glucemia, que conlleva la liberación de insulina por parte de las células β -pancreáticas. Esta hiperinsulinemia estimula la liberación en plasma de leptina, que llega hasta el cerebro provocando una sensación de saciedad e inhibiendo la ingesta. Sin embargo, un consumo de fructosa, tal y como se ha

mencionado anteriormente, no provoca un aumento de los niveles de insulina, por lo que no se estimula la liberación de leptina y el cerebro no recibe la señal de saciedad (Teff y col., 2004). De esta manera, la fructosa produce un aumento de peso en el individuo de una manera indirecta, al inhibir a nivel de sistema nervioso central la sensación de saciedad. Esta inhibición es una propiedad exclusiva de la fructosa y que no posee la glucosa, tal y como demostraron Teff y colaboradores (2004) en su estudio clínico comparativo entre el consumo de estos dos azúcares en mujeres.

Otra de las alteraciones detectadas en humanos como consecuencia de un consumo de fructosa es la hiperuricemia. Algunas investigaciones señalan que la aparición de esta alteración es dosis-dependiente y que es suficiente un consumo de 0.5 g de fructosa por kilo de peso y hora para provocar una elevación de ácido úrico en plasma (Mayes, 1993). Esta hiperuricemia actuaría como factor para predecir una posible hipertensión arterial. Este aumento de ácido úrico en plasma tras un consumo de fructosa es resultado de la capacidad que tiene este azúcar en provocar alteraciones también en el metabolismo de las purinas (Johnson y col., 2013). Además, se ha demostrado, tanto en humanos como en roedores, que esta capacidad de producir hiperuricemia es exclusiva de la fructosa (Johnson y col., 2007), debido al metabolismo particular que experimenta este azúcar en el hepatocito y que será detallado más adelante. Aunque este incremento en las concentraciones de ácido úrico se ha asociado históricamente como un factor de riesgo para producir la enfermedad conocida como “gota”, estudios recientes sugieren que éste puede ser la clave para explicar la manera en la cual la fructosa produce alteraciones cardiovasculares.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la fructosa está considerada como el azúcar con mayor capacidad de aumentar los niveles de triglicéridos plasmáticos y explicaría así el efecto hipertriglicéridémico que posee la sacarosa. Por último, sería importante destacar la existencia de diferencias entre géneros en cuanto a la aparición de efectos adversos producidos por la ingesta de fructosa. Así, Bantle y colaboradores (2000) demostraron cómo una dieta rica en fructosa (17% del total de energía consumida) incrementaba en un 32% los niveles de triglicéridos plasmáticos postpandriales en hombres sanos después de 6 semanas. Sin embargo, esta alteración no se observó en mujeres sanas. Estos resultados demuestran la existencia de una diferencia entre géneros del metabolismo de la fructosa, sugiriendo que las mujeres son más resistentes a los efectos de la fructosa. Profundizando en este campo, estudios realizados con animales proponen que los estrógenos juegan un papel protector, ya que se ha visto que cuando las hembras son ovariectomizadas, la respuesta a la fructosa es similar a la de los machos (Roberts y col., 2001; Galipeau y col., 2002).

1.3.1) Fructosa y síndrome metabólico

Tal y como se ha señalado hasta ahora, en las últimas décadas se ha observado por parte de la población un aumento en la ingesta de calorías provenientes de azúcares añadidos en bebidas y otros alimentos que ha provocado, entre otras alteraciones metabólicas, un incremento en la prevalencia de la obesidad, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2.

El síndrome metabólico (SM), también conocido como síndrome plurimetabólico o síndrome X, es un conjunto de factores de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y de enfermedades cardiovasculares, caracterizado por la presencia de hipertensión, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, dislipemia aterogénica y obesidad y estado protrombótico y proinflamatorio (Grundy y col., 2005). El SM no se trata de una única enfermedad, sino de una asociación de problemas de salud que pueden aparecer de forma simultánea o secuencial en un mismo individuo. Estos problemas están causados por la combinación de factores genéticos y ambientales, asociados estos últimos al estilo de vida y donde la ausencia de actividad física y la dieta juegan un papel importante. La presencia de síndrome metabólico se relaciona con un incremento significativo de riesgo de sufrir diabetes, enfermedad coronaria y enfermedad cerebrovascular, así como con un aumento de la morbimortalidad de origen aterosclerótico.

No existe una definición consensuada internacionalmente, aunque desde un punto de vista práctico y clínico los parámetros más extendidos para identificar y diagnosticar el síndrome metabólico son los propuestos por el *National Cholesterol Education Program – Third Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP-III) en el año 2001 y actualizados posteriormente por la *American Heart Association* (AHA) en 2005.

Según este criterio, el diagnóstico de síndrome metabólico se establece cuando están presentes, al menos, tres de los siguientes factores de riesgo (tabla II-1):

	Obesidad abdominal (perímetro cintura)	Triglicéridos plasmáticos	Colesterol HDL	Presión arterial	Glucosa plasmática en ayunas
Hombres	> 102 cm	≥ 150 mg/dl	< 40 mg/dl	≥ 130 / ≥ 85 mmHg	≥ 100 mg/dl
Mujeres	> 88 cm	≥ 150 mg/dl	< 50 mg/dl	≥ 130 / ≥ 85 mmHg	≥ 100 mg/dl

Tabla II-1: Identificación clínica del síndrome metabólico propuesta por el NCEP ATP-III en el año 2001 y actualizada posteriormente por el AHA en 2005.

Sin embargo, existen otros organismos internacionales que incorporan modificaciones a la hora de diagnosticar el SM. La Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye como criterio necesario la presencia de diabetes, la tolerancia anormal a la glucosa o la resistencia a la insulina, añadiendo además el índice cintura-cadera y la presencia de microalbuminúria. El

grupo europeo para el estudio de la resistencia a la insulina (EGIR) varía la cifras de triglicéridos (>180 mg/dl, tanto para hombres como para mujeres), disminuye el perímetro abdominal (>94 cm en hombres y >80 cm en mujeres) y agrega también la resistencia a la insulina o hiperinsulinemia en ayunas superior al percentil 75. En el año 2005, la *International Diabetes Federation* (IDF) propuso una nueva definición para el síndrome metabólico, compartiendo la mayoría de los criterios propuestos por la NCEP ATP-III y considerando indispensable la presencia de obesidad abdominal. En Europa, el límite que se establece para el perímetro abdominal es de ≥ 94 cm en varones y ≥ 80 cm en mujeres.

La prevalencia del síndrome metabólico varía según factores como el género o la edad, y se ha observado que se encuentra en constante aumento debido a los hábitos sedentarios y alimenticios por parte de la población, paralelamente a un incremento de la obesidad. En un estudio realizado en España (Martínez-Candela y col., 2006) se comparó la prevalencia del SM en este país utilizando tres de los criterios existentes. De esta forma, se encontró que la prevalencia de esta enfermedad era mayor en hombres que en mujeres y que aumentaba con la edad, sin importar el criterio utilizado. Sin embargo, a la hora de analizar la prevalencia del SM, ésta variaba en función del criterio que se había utilizado: 35.3% según el criterio de la OMS, 20.2% según el criterio de la NCEP ATP-III y 24% según el criterio de la EGIR.

Entre los factores de riesgo capaces de producir síndrome metabólico, se encuentran los factores de riesgo modificables (dieta, actividad física, tabaquismo,...) y los factores de riesgo no modificables (edad y herencia genética).

Con respecto a los factores de riesgo no modificables, la dotación génica de cada individuo juega un papel muy importante en la aparición del SM. Es lógico pensar que, debido a la gran cantidad de componentes que forman el síndrome metabólico (obesidad, dislipemia, hiperglucemia, hipertensión arterial, etc.), todos ellos con una base génica, podemos encontrar muchos genes candidatos a tener gran importancia en el desarrollo de esta enfermedad. Por ejemplo, la adiposidad visceral se ha asociado a polimorfismos en el gen *adipoq*, que codifica para la hormona adiponectina (Sutton y col., 2005). Por otro lado, los niveles de lípidos plasmáticos se han asociado a variaciones de los genes que codifican para las apolipoproteínas E y C-III (APOE y APOC3, respectivamente) (Sing y Davignon, 1985; Waterworth y col., 2000).

Entre los factores de riesgo modificables capaces de provocar la aparición del síndrome metabólico cabe destacar la dieta. Son diversos los estudios que describen una asociación positiva entre el consumo de bebidas edulcoradas y el riesgo de sufrir síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2 y cardiopatía coronaria (Hu y Malik, 2010; Dhingra y col., 2007).

1.3.2) Fructosa y esteatosis hepática no alcohólica

La esteatosis hepática no-alcohólica (*Non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) es un problema de salud que afecta a 70 millones de adultos en Estados Unidos, lo que representa al 30% de la población adulta. Además, el 20% de estos individuos presenta la forma más severa de la NAFLD, la esteatohepatitis no-alcohólica (*Non-alcoholic steatohepatitis*, NASH) (Zivkovic y col., 2007). La NAFLD se define como una acumulación de lípidos, principalmente en forma de triglicéridos, en el hígado de individuos con un consumo mínimo de alcohol (< 20 g etanol/día). Dada la estrecha relación existente entre la obesidad, el síndrome metabólico y el desarrollo de NAFLD, no es de extrañar que la mayoría de pacientes con NAFLD presenten múltiples componentes del síndrome metabólico. Uno de los mejores marcadores a la hora de detectar NAFLD es la presencia de resistencia a la insulina, incluso en pacientes que no presentan sobrepeso (Marchesini y col., 1999). Al igual que el síndrome metabólico, la NAFLD es una enfermedad multifactorial que depende de factores genéticos y también ambientales.

La fructosa juega un papel importante en el desarrollo de la NAFLD. Son varios los estudios que muestran un mayor consumo de fructosa en individuos con NAFLD (Ouyang y col., 2008; Thuy y col., 2008). En un estudio clínico, Abdelmalek y colaboradores (2010) analizaron la asociación entre el consumo de fructosa y el síndrome metabólico, así como la aparición de características histológicas de hígado graso en pacientes con NAFLD. Estos investigadores determinaron cómo una ingesta de fructosa en humanos estaba estrechamente relacionada con la aparición de varios componentes del SM, incluyendo hipertrigliceridemia, niveles bajos de colesterol HDL (*high density lipoprotein*), e hiperuricemia. Ouyang y colaboradores (2008) mostraron cómo un consumo elevado de fructosa en pacientes con NAFLD provocaba un gran aumento en la expresión hepática del mRNA que codifica para la proteína ácido graso sintasa (FAS), que cataliza el paso limitante en la biosíntesis de ácidos grasos. De esta manera, se sugirió que esta alteración en el metabolismo del hígado producida por el consumo de fructosa podría ser crucial para explicar el alto contenido lipídico a nivel hepático en pacientes con NAFLD. A este hecho hay que sumarle que la fructosa puede participar en el desarrollo de NAFLD mediante el incremento de la concentración de triglicéridos postprandiales, que puede derivar en una esteatosis hepática (Huang y col., 2011).

Además de la capacidad de producir esteatosis, la fructosa también juega un papel importante como agente iniciador de la inflamación hepática en pacientes con NAFLD. Estudios en este campo, demuestran cómo una ingesta rica en fructosa es capaz de provocar un aumento en la permeabilidad intestinal, permitiendo así el paso de endotoxinas (lipopolisacáridos de la membrana externa de las bacterias presentes en el intestino) a la circulación sistémica, lo que provoca inflamación crónica en el hígado, asociada además a anomalías metabólicas (Bergheim y col., 2008; Laugerette y col., 2011). Spruss y colaboradores (2009) demostraron en ratones cómo, efectivamente, el NAFLD inducido por fructosa podría ser causado por un aumento en la permeabilidad intestinal, que conlleva a una activación de las células de Kupffer presentes en el hígado. Este estudio se basa en el incremento de la permeabilidad de la mucosa del intestino

delgado encontrado en ratones obesos tras una ingesta de dieta grasa, lo que provocó en dichos animales una endotoxemia a nivel portal. Estas endotoxinas bacterianas procedentes del intestino llegan hasta el hígado, activando a las células de Kupffer (macrófagos hepáticos), gracias al complejo *Toll-like receptor 4* (TLR-4) de la superficie celular. Este receptor pertenece a la familia de receptores *Toll-like* que juegan un papel crucial en la defensa del organismo contra patógenos exógenos. La interacción del complejo TLR-4 con las endotoxinas provoca la activación del factor de diferenciación mieloide 88 (*myd88*, *myeloid differentiation factor 88*) y la subsecuente activación de factores nucleares de transcripción, que provoca la liberación de numerosos mediadores proinflamatorios, como por ejemplo TNF α (*tumor necrosis factor alpha*), que a la vez es capaz de inducir daño hepático y fibrosis.

En este último aspecto, una fibrosis hepática es el resultado de diversas enfermedades crónicas en el hígado, entre las que se incluyen la NASH (cuadro más severo de la NAFLD), y es la causante de la muerte de hepatocitos, así como de la formación de cuerpos apoptóticos que liberan factores que sirven como señal de reclutamiento de células inflamatorias (como neutrófilos, monocitos, macrófagos o linfocitos) en el hígado dañado. Estas células, en concreto los macrófagos (células de Kupffer), producen citocinas inflamatorias que activan a los miofibroblastos productores de colágeno tipo I, que no están presentes en el hígado sano (Xu y col., 2014). Estos miofibroblastos producen y secretan colágeno tipo I, el marcador más importante de fibrosis. Un estado avanzado de fibrosis es capaz de progresar hasta la aparición de cirrosis y también de un carcinoma hepatocelular. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la fibrosis hepática puede ser reversible, cesando así el daño en el hígado. Para ello, debe cesar la actividad de los miofibroblastos fibrogénicos y debe reabsorberse el depósito de colágeno previamente formado. En este punto, adquieren importancia los macrófagos, capaces de secretar enzimas degradadores de la matriz, como son las colagenasas (Xu y col., 2014). De este modo, un aumento en los niveles de colagenasa sería indicativo de una mejora de la fibrosis hepática, mientras que un descenso de los mismos, indicaría todo lo contrario.

En lo referente a humanos, el papel potencial de la endotoxemia en la patogénesis de la NAFLD ha sido elucidado gracias al estudio clínico de Thuy y colaboradores (2008), que demostraron cómo los niveles de endotoxinas en plasma eran significativamente mayores en pacientes con NAFLD en comparación con pacientes control, y este hecho estaba relacionado de una manera directa con una ingesta de carbohidratos, incluida la fructosa. Además, los autores plantean la posibilidad de que esta endotoxemia en pacientes con NAFLD puede ser resultado de un aumento de la permeabilidad intestinal provocada por la ingesta de fructosa.

Otro marcador característico de toxicidad en el hígado asociada a una esteatosis hepática es la quimiocina MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*). Se ha observado que ratones transgénicos que sobreexpresan MCP-1 en el tejido adiposo, presentan resistencia a la insulina y un aumento en los triglicéridos hepáticos. Estos estudios se basan en la observación de que ratones alimentados con dieta grasa inducen la expresión de MCP-1 en el tejido adiposo, pero no así en el hígado (Kanda y col., 2006). Además, gracias a estudios *in vitro*, se ha demostrado

cómo MCP-1 puede inducir la acumulación de lípidos en cultivo de hepatocitos (Clément y col., 2008). Estos estudios indican cómo MCP-1 juega un papel importante en una respuesta inflamatoria en el hígado, así como en la aparición de esteatosis durante un daño en este tejido, si bien son varios los estudios que defienden la teoría de que este marcador se asocia más a una esteatosis provocada por un consumo de alcohol (Mandrekar y col., 2011).

Relacionado con la inflamación, se encuentra el conocido como estrés oxidativo, fenómeno causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad del organismo para reparar el daño resultante. Se ha propuesto al estrés oxidativo como agente importante en la aparición de resistencia a la insulina en pacientes con hiperglucemia. Se ha descrito cómo las especies reactivas en oxígeno son capaces de inhibir la transducción de señal producida por insulina, mediante la activación de las cinasa PKC y JNK, así como del factor de transcripción NFκB (Ye, 2013). Además, las ROS son capaces de mediar en la producción de factores como TNFα, que tiene un papel destacado en procesos inflamatorios.

1.4) Metabolismo de la fructosa: diferencias con respecto a la glucosa

La molécula de fructosa se diferencia de la de glucosa por la existencia de un grupo cetona unido al carbono 2, mientras que la glucosa tiene un grupo aldehído en el carbono 1. En el disacárido de sacarosa, ambos monosacáridos se encuentran unidos por un enlace o-glucosídico (figura II-2).

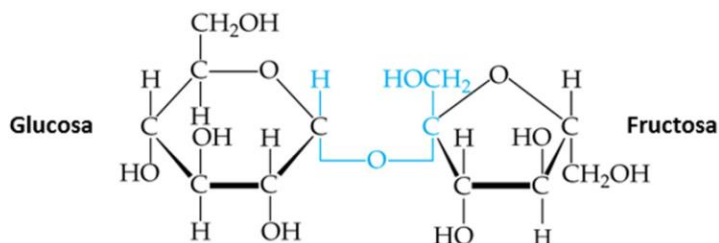


Figura II-2. Disacárido de sacarosa, formado por un monosacárido de glucosa y uno de fructosa.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la fructosa no presenta los mismos efectos sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos que la glucosa. Esto es debido a que la fructosa es un azúcar altamente lipogénico y a que no todos los carbohidratos siguen las mismas rutas metabólicas ni tienen efectos biológicos equivalentes.

Para poder entender los efectos específicos provocados tras el consumo de fructosa, es importante remarcar las diferencias que ésta tiene con respecto a la glucosa. La fructosa libre presente en los alimentos no requiere de digestión química para ser absorbida. Por su parte, la fructosa que forma parte de la molécula de sacarosa es liberada durante la digestión de la misma en el intestino delgado. El enzima que rompe el enlace o-glucosídico que mantiene unidas a las moléculas de fructosa y glucosa forma parte de un complejo enzimático conocido como sacarasa-isomaltasa, que se encuentra anclado en el borde en cepillo de los enterocitos.

La fructosa presente en el intestino se transporta al interior del enterocito gracias a su transportador específico GLUT5, que se expresa principalmente en ayunas en el polo apical de los enterocitos del duodeno y yeyuno. Sin embargo, la glucosa penetra al interior del enterocito gracias a un sistema de transporte específico dependiente de sodio, que además requiere gasto energético en forma de ATP. Una vez en el interior del enterocito, tanto la fructosa como la glucosa, pasan a nivel portal mediante el transportador GLUT2, localizado en la membrana basolateral del enterocito (Douard y Ferraris, 2008; Tappy y Lê, 2010). A partir de la sangre portal, la fructosa llega al hígado y después al resto de células de los tejidos, donde se metaboliza. El metabolismo de este azúcar se da principalmente en el hígado, órgano que metaboliza entre el 50-75% de la fructosa ingerida (Álvarez y col., 2012). Precisamente aquí encontramos otra diferencia entre el metabolismo de la fructosa y de la glucosa, ya que mientras la glucosa es metabolizada tanto a nivel hepático como extrahepático (músculo esquelético, tejido adiposo, cerebro...), es muy poca la cantidad de fructosa que escapa del metabolismo hepático y llega a circulación sistémica (Schaefer y col., 2009). En este sentido, se ha observado que después de la ingesta de 1 gramo de fructosa por cada Kg de masa corporal, la concentración de fructosa en plasma sólo llega hasta 0.5 mM, mientras que la ingesta de una cantidad similar de glucosa aumenta la glucemia hasta una concentración de 10 mM (Havel, 2005).

De esta forma, tras la absorción de la fructosa a nivel intestinal y su posterior paso a sangre portal, ésta entra rápidamente y de una forma muy eficaz en el hígado, gracias al transportador GLUT2 (Tappy y Lê, 2010). Una vez en el interior del hepatocito la fructosa es metabolizada a fructosa-1-fosfato gracias a la acción del enzima fructocinasa (FK), que es altamente específico para la fructosa. Debido al bajo K_m y a la elevada V_{max} que posee este enzima, el metabolismo de la fructosa en el hígado se da de una forma rápida. El siguiente paso en la metabolización de la fructosa, consiste en el paso de fructosa-1-fosfato a dihidroxiacetona-fosfato y gliceraldehído, gracias a la acción de la aldolasa. Este gliceraldehído formado, a su vez dará lugar a gliceraldehído-3-fosfato, que puede entrar en la vía glucolítica y transformarse en piruvato (figura II-3).

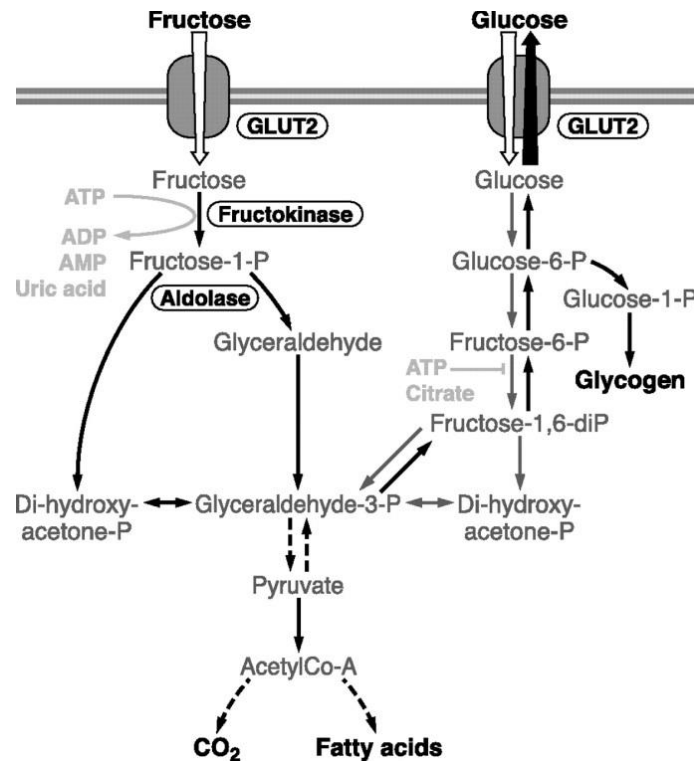


Figura II-3. Metabolismo de la fructosa y la glucosa en el interior de las células hepáticas. Imagen de Tappy y Lê (2010).

El metabolismo hepático de la fructosa difiere del de la glucosa en diferentes aspectos. En primer lugar, la entrada de glucosa en la vía glucolítica se produce bajo el control del enzima glucocinasa (GK), que fosforila la glucosa a glucosa-6-fosfato. Este enzima está caracterizado por tener un alto K_m para la glucosa, por lo que el ratio de fosforilación de la glucosa variará en función de la concentración plasmática de glucosa (Iynedjian, 1993). Posteriormente, esta glucosa-6-fosfato se convierte primero en fructosa-6-fosfato y, seguidamente, en fructosa-1,6-difosfato gracias a la fosfofructocinasa. Este enzima se inhibe por altas concentraciones de ATP intracelular y citrato, lo que permite una regulación de esta vía en función del estado energético de la célula (Tornheim y Lowenstein, 1976). Como paso final, la fructosa-1,6-difosfato resultante se metaboliza para dar lugar a las triosas fosfato dihidroxiacetona-fosfato y gliceraldeído-3-fosfato, convergiendo en este punto con el metabolismo de la fructosa (Tappy y Lê, 2010) (figura II-3).

Tal y como se ha citado, el metabolismo de la glucosa posee un mecanismo de retroalimentación negativa debido a la inhibición del enzima fosfofructocinasa por unos niveles elevados de ATP y citrato. Sin embargo, la fructosa no sólo elude este mecanismo de retroalimentación negativa, sino que además este azúcar es capaz de regular positivamente su propio metabolismo (Havel, 2005). Así, se ha demostrado cómo una administración de fructosa provoca el incremento de marcadores característicos en la metabolización de este azúcar, como el transportador GLUT5 y el enzima fructocinasa (Ouyang y col., 2008; Johnson, Perez-Pozo y col., 2009).

Otro hecho diferencial entre el metabolismo de la fructosa y de la glucosa es la independencia de la primera de la acción de la insulina. La conversión de glucosa a piruvato está regulada por insulina, que estimula la expresión del gen de la glucocinasa y activa los enzimas glucolíticos. Al contrario de lo que ocurre con la glucosa, la conversión de fructosa a triosas-fosfato es un fenómeno que tiene lugar independientemente de la acción de la insulina, y es un proceso rápido debido al bajo K_m de la fructocinasa para la fructosa y a la ausencia de inhibición negativa por parte de ATP o citrato (Tappy y Lê, 2010).

La mayor parte de las triosas-fosfato producidas por el metabolismo de la fructosa pueden ser convertidas a glucosa y glucógeno a través de la gluconeogénesis, pero también pueden seguir otras rutas, como ser convertidas a piruvato y ser oxidadas a CO_2 y H_2O en el ciclo de Krebs para la obtención de energía, o bien ser utilizadas para generar triglicéridos en el proceso de lipogénesis *de novo* (Tappy y Lê, 2010). Una pequeña porción de triosas-fosfato puede utilizarse también para la producción de lactato, gracias al enzima lactato deshidrogenasa (LDH), liberando de esta forma moléculas de lactato a la circulación (Bjorkman y col., 1989).

Tras analizar el metabolismo de la fructosa y compararlo con el de la glucosa, observamos la facilidad con la que la fructosa puede transformarse en triglicéridos. Esta característica, juntamente con la inducción de su propio metabolismo, confiere a este azúcar la enorme capacidad para inducir hipertrigliceridemia.

1.5) La rata como modelo experimental: Estudios previos

La rata es el animal más utilizado a la hora de investigar los mecanismos por los cuales la fructosa causa alteraciones metabólicas. Esto se debe a que la rata, al igual que el humano, pero a diferencia de otros roedores (como por ejemplo el ratón), no es capaz de transformar parte de la fructosa ingerida en la dieta en glucosa, ya que carece del enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pc) en su intestino (Mayes, 1993). De esta forma, toda la fructosa administrada de forma experimental en este modelo animal, será metabolizada como tal y los efectos observados serán debidos exclusivamente a este azúcar. Además, una administración de fructosa en ratas produce unos desequilibrios metabólicos similares a los que padecen los humanos con síndrome metabólico, por lo que son varios los estudios que aceptan a la rata alimentada con fructosa como un buen modelo para el estudio de este síndrome (Nagai y col., 2002). Es importante destacar cómo un consumo de fructosa es incapaz de aumentar la glucemia en plasma de manera directa, debido a la incapacidad de este azúcar de transformarse en glucosa en el intestino humano.

Se ha observado cómo dietas sólidas en las que se incluye fructosa en una proporción 50-60%, inducen hipertrigliceridemia y una pronunciada resistencia a la insulina (Nagai y col., 2002; Nagata y col., 2004). En cambio, las dietas que incorporan un 10% (p/v) de fructosa en el agua de bebida, inducen también hipertrigliceridemia y esteatosis hepática en un periodo de tiempo corto, pero sin alterar la glucemia ni la sensibilidad a la insulina (Roglans y col., 2002). Este

segundo modelo de administración de fructosa mimetiza el patrón de consumo humanos y permite una ingesta de fructosa diaria equivalente a la que se encuentra en el cuartil superior de la población humana (Alegret y col., 2011).

Así, mediante este modelo experimental de administración de fructosa, nuestro grupo de investigación ha caracterizado a nivel molecular algunos de los efectos perjudiciales que este azúcar provoca sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Estudios comparativos entre el consumo de fructosa y glucosa durante 14 días en ratas *Sprague-Dawley* macho demostraron cómo únicamente la fructosa era capaz de provocar hipertrigliceridemia y esteatosis hepática como consecuencia de una reducción del catabolismo lipídico (Roglans y col., 2007). Posteriormente, un estudio similar, pero esta vez sobre ratas *Sprague-Dawley* hembra, demostró cómo los efectos metabólicos producidos tras un consumo de fructosa presentaban diferencias entre géneros, ya que en este segundo estudio la hipertrigliceridemia y la esteatosis hepática estuvieron acompañadas de hiperglucemia, hiperinsulinemia y un estado de intolerancia a la glucosa (Vilà y col., 2011). Además, se demostró cómo este efecto exclusivo de la fructosa frente a la glucosa de producir hipertrigliceridemia y esteatosis hepática era debido a la suma de dos factores: incremento de la síntesis hepática de ácidos grasos y disminución de la oxidación de los mismos por parte del hígado (Roglans y col., 2007; Rebollo y col., 2014b). También se demostró que en ratas *Sprague-Dawley* hembra los cambios metabólicos producidos por la ingesta de fructosa eran debidos a alteraciones importantes en la homeostasis de la glucosa, con una reducción evidente en los niveles de la proteína IRS2 (*Insulin Receptor Substrate-2*), que juega un papel importante en la vía de señalización de la insulina y cuyo déficit se ha relacionado con fenómenos de resistencia a la insulina (Rebollo y col., 2014a).

Un posible inconveniente que puede presentar el modelo de rata alimentada con fructosa es el hecho de que este animal es resistente al desarrollo de procesos ateroscleróticos, por lo que para profundizar en el estudio de este campo es necesaria la utilización de otro modelo experimental. En este caso, se ha aceptado al ratón deficiente para el receptor de las LDL ($rLDL^{-/-}$) como un buen modelo para estudiar la aterosclerosis inducida por la dieta (Tangirala y col., 1995).

Tal y como se ha mencionado hasta ahora, la fructosa es un azúcar capaz de provocar numerosas alteraciones metabólicas, afectando sobre todo a la homeostasis de lípidos y carbohidratos. Son muchas las rutas moleculares en las que la fructosa ejerce su acción, ya sea de manera directa o indirecta, provocando una alteración del funcionamiento correcto de las mismas. El presente trabajo se ha centrado en el estudio de estas alteraciones gracias al análisis de las diferentes vías implicadas, que se explican con más detalle a continuación.

2) INSULINA Y METABOLISMO DE LA GLUCOSA

En un individuo sano, los niveles de glucosa en plasma se mantienen constantes en un rango de entre 4 – 7 mM, en función de si el sujeto se encuentra en ayunas o en estado postprandial (Saltiel y Khan, 2001). Este control de la glucemia tiene lugar gracias al balance entre la absorción intestinal de glucosa, la producción de la misma por el hígado y su captación y metabolización por parte de tejidos periféricos, fenómenos que dependen de la insulina.

La insulina es una hormona producida y secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas. Su producción se estimula en respuesta a un aumento en los niveles de glucosa en plasma y juega un papel importante en el control de la homeostasis de la misma. Los principales mecanismos a través de los cuales la insulina ejerce este control son el aumento de la captación de glucosa por parte del tejido muscular y adiposo, y la inhibición de la producción de la glucosa (gluconeogénesis) en el hígado. Además, esta hormona también promueve el aumento de la lipogénesis en hígado y tejido adiposo, así como de la síntesis de glucógeno por parte de hígado y músculo. Otra acción de la insulina es la inhibición de la lipólisis en tejido adiposo y la estimulación de la síntesis de proteínas en músculo. (Saltiel y Khan, 2001) (Figura II-4).

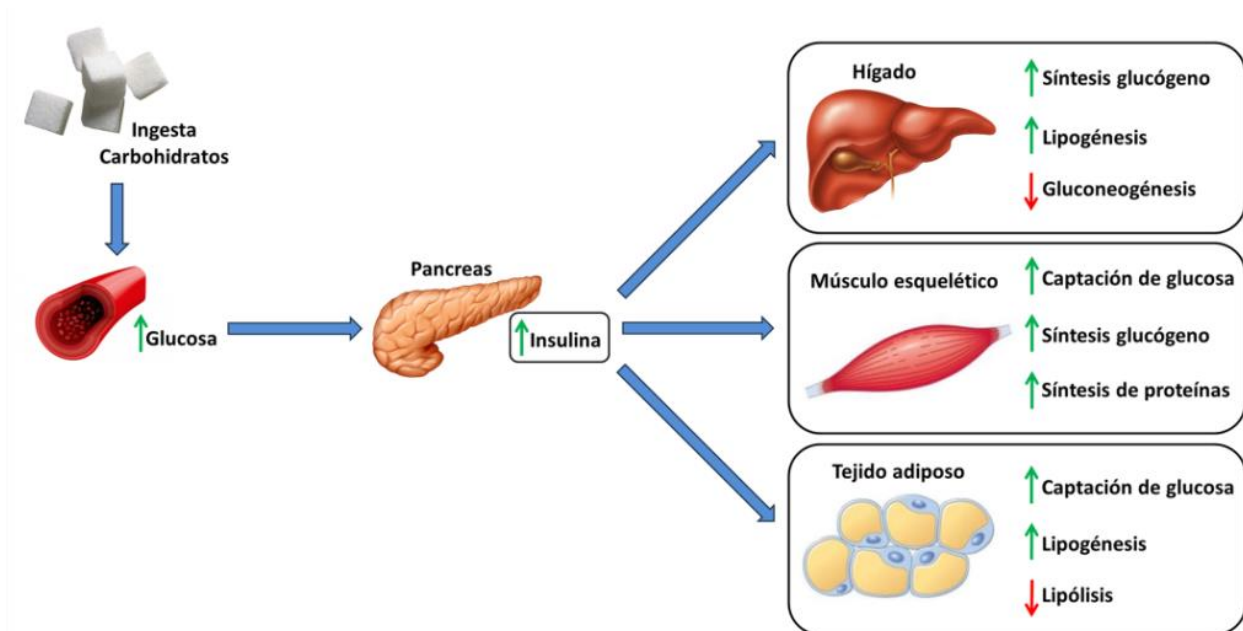


Figura II-4. Acción de la insulina en sus tres principales tejidos diana.

El principal tejido que capta la glucosa en plasma como respuesta a una estimulación por insulina es el tejido muscular esquelético, capaz de captar y metabolizar en su interior el 75% de la glucosa plasmática. Por el contrario, el tejido adiposo, otro tejido sensible a la insulina, capta esta glucosa en mucha menor medida (Klip y Paquet, 1990). Existen otros tejidos no dependientes de la acción de la insulina, como el cerebro o las células β del páncreas, pero aun así ejercen un papel importante en la homeostasis de la glucosa. Debido a su gran importancia como agente regulador de la glucemia, un fenómeno de resistencia a la insulina conduce a una

alteración de los procesos en los que esta hormona ejerce su acción, provocando niveles elevados de glucosa y lípidos en plasma, tanto en ayunas como en un estado postprandial (Saltiel y Khan, 2001).

2.1) Insulina y transportadores de carbohidratos

El transporte de monosacáridos, polioles y otras pequeñas moléculas a través de las membranas plasmáticas de las células eucariotas está mediado por la familia de proteínas GLUT, formada por proteínas integrales de membrana codificadas por los genes *slc2*. Actualmente se conocen 14 proteínas GLUT, aunque las mejor caracterizadas son las 5 primeras (GLUT1-5). Dentro de éstas, cabe destacar GLUT2, presente en hígado e intestino, y que es capaz de transportar glucosa y fructosa (Mueckler y Thorens, 2013). Otros dos transportadores muy bien caracterizados y de gran interés en el presente trabajo son GLUT4 y GLUT5. El primero de ellos es un transportador específico de glucosa, dependiente de insulina y presente casi exclusivamente en el tejido adiposo y en el tejido muscular, ambos importantes en la regulación metabólica de carbohidratos y lípidos. GLUT5, en cambio, es un transportador exclusivo de fructosa independiente de insulina localizado en la membrana apical de los enterocitos del intestino delgado y, en menor medida, en el músculo esquelético y tejido adiposo (Mueckler y Thorens, 2013).

2.2) Vía de señalización de la insulina

2.2.1) Receptor de insulina y sustrato del receptor de insulina

El receptor de insulina (IR, *insulin receptor*) es una proteína de membrana heterotetramérica formada por dos subunidades α y otras dos subunidades β . La molécula de insulina se une a la subunidad α del IR, que sufre un cambio conformacional que conlleva a la activación de la cinasa de la subunidad β . De esta forma, se produce una reacción de transautofosforilación donde una subunidad β fosforila residuos tirosina de la subunidad β adyacente. El sustrato para el receptor de la insulina (IRS, *insulin receptor substrate*) interacciona con el IR gracias a la presencia en su estructura de un módulo de unión a residuos fosfotirosinas (PTB, *phosphotyrosine binding module*), lo que provoca la fosforilación del propio IRS en residuos tirosina cuando el IR está activado (Khan y Pessin, 2002). Estos residuos fosfotirosinas de la proteína IRS pueden interactuar con moléculas adaptadoras que contienen dominios SH2 (*Src Homology 2*), como por ejemplo la proteína p85, subunidad reguladora de la proteína PI3K (fosfoinositol-3-cinasa).

Existen diferentes proteínas IRS, siendo las más importantes para la regulación del metabolismo glucídico IRS1 e IRS2 (Schinner y col., 2005). IRS1 es el principal mediador de la señalización de la insulina en músculo esquelético, tejido adiposo y células β -pancreáticas; mientras que IRS2 predomina en el hígado. Poco se sabe acerca de otros IRS, como IRS3 e IRS4, aunque algunos

datos sugieren que estos sustratos pueden actuar como reguladores negativos de IRS1 e IRS2 (Tsuruzoe y col., 2001).

2.2.2) Vía de señalización PI3K-Akt

La proteína PI3K se encuentra presente en el citosol de la célula en forma de dímero, formado por una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110). Tras la estimulación por insulina, y gracias a su dominio SH2, la subunidad p85 de PI3K es reclutada por los residuos fosfotirosina de la proteína IRS, lo que provoca el transporte de la subunidad p110 hasta la membrana plasmática. En esta nueva localización celular, la subunidad p110 cataliza la formación de PIP₃ (*phosphatidylinositol triphosphate*) a partir de PIP₂ (*phosphatidylinositol biphosphate*) (Khan y Pessin, 2002).

Las moléculas de PIP₃ generadas por PI3K estimulan la actividad de diferentes moléculas, entre ellas, la PDK1 (cinasa dependiente de fosfatidilinositol 1), una serina cinasa que fosforila y activa a la serina/treonina cinasa Akt (también conocida como proteína cinasa B, PKB) (Saltiel y Kahn, 2001) (figura II-5).

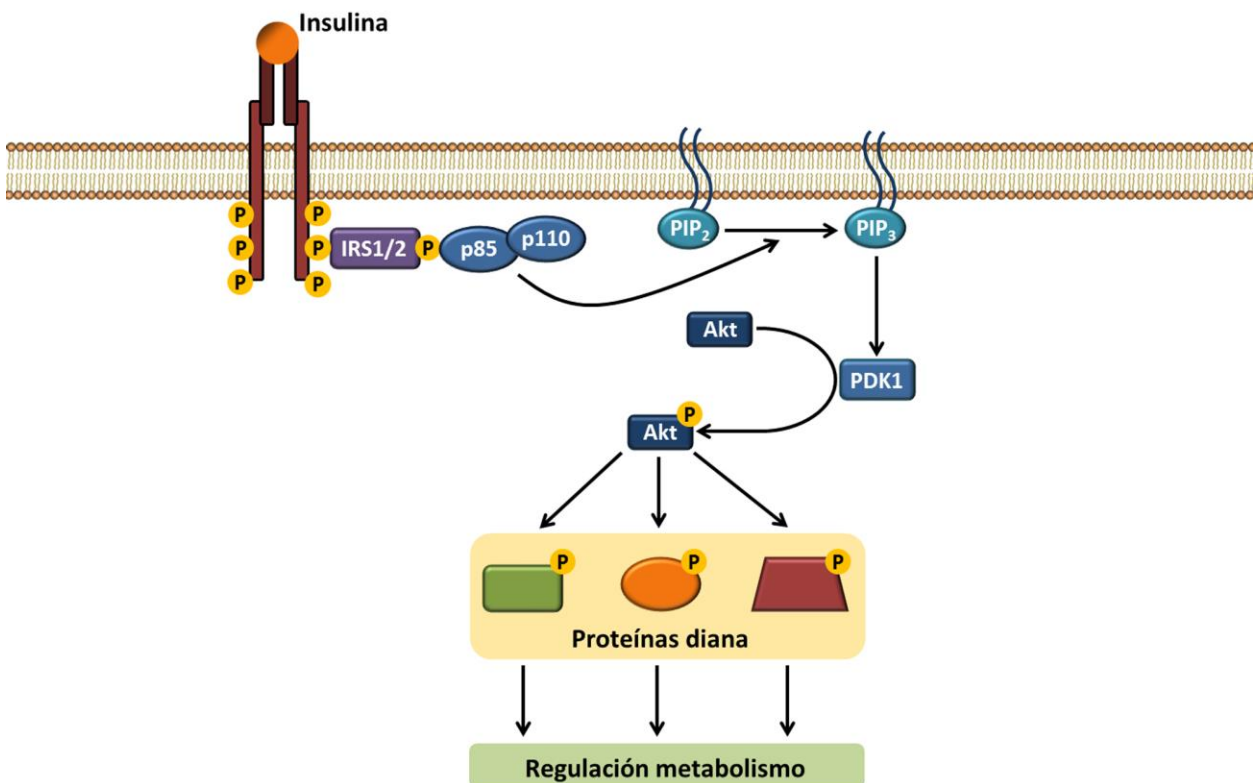


Figura II-5. Mecanismo de activación de Akt dependiente de insulina.

Esta activación de Akt tiene consecuencias metabólicas muy importantes, ya que esta cinasa es capaz de fosforilar y regular moléculas que participan en la homeostasis de carbohidratos. Este trabajo se centra en el estudio de la vía de la insulina en el hígado y en tejidos periféricos como el musculo esquelético y el tejido adiposo. Es por este motivo, que a continuación se detallan las consecuencias de la activación de la proteína Akt en estos tejidos.

2.2.2.a) Activación de Akt en hígado: Importancia del factor de transcripción FoxO1

Tras una estimulación por insulina, el hígado responde con la regulación de determinadas vías metabólicas con el objetivo de mantener la homeostasis de la glucosa. Dentro de esta regulación por parte del hígado, podemos encontrar la activación en la síntesis de glucógeno a partir de la glucosa que entra en el tejido y la inhibición de la formación de nuevas moléculas de glucosa.

El sustrato mejor caracterizado de la proteína Akt es la cinasa 3 de la glucógeno sintasa (GSK3 β), un enzima crucial en la regulación de la síntesis de glucógeno a nivel hepático y también a nivel muscular, ya que la mayor parte de la glucosa captada en plasma después de una estimulación por insulina se almacena en forma de glucógeno en estos dos tejidos. En condiciones basales, GSK3 β se encuentra activa, fosforilando e inactivando de esta manera a la glucógeno sintasa (GS). La fosforilación de GSK3 β por medio de la cinasa Akt comporta su inactivación y, en consecuencia, se produce el aumento en la actividad del enzima glucógeno sintasa (Schinner y col., 2005), favoreciendo así la síntesis de glucógeno a partir de glucosa proveniente de la dieta.

Por otro lado, también se ha estudiado el efecto de la activación de la Akt sobre la formación de nuevas moléculas de glucosa. Se ha determinado cómo la insulina inhibe la expresión a nivel transcripcional de dos enzimas claves en el proceso gluconeogénico, la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pc), gracias a la activación de la vía de Akt (Liao y col., 1998; Schmoll y col., 2000). El promotor de ambos genes contiene un elemento en respuesta a insulina (IRE, *insulin-responsive element*) que es esencial para la regulación de estos genes. El factor de transcripción FoxO1 (*Forkhead box protein O1*) es un sustrato de Akt que contiene dominios de reconocimiento a estas secuencias IRE y que es capaz de activar la transcripción de estos genes. Akt es capaz de fosforilar e inactivar a FoxO1, ya que la fosforilación de este factor de transcripción provoca que éste quede retenido en el citosol sin poder translocar a núcleo e incapacitándolo así para ejercer su función (Haas y Biddinger, 2009).

Una proteína importante en la regulación de la gluconeogénesis a través de la vía Akt – FoxO1 es la MAPK fosfatasa-3 (MKP-3), que es capaz de eliminar los grupos fosfato que inactivan al factor de transcripción FoxO1, provocando que éste sea de nuevo activo y transloque a núcleo, para inducir la expresión de las enzimas PEPCK y G6Pc. De hecho, se ha observado cómo una reducción en los niveles de esta fosfatasa provoca un descenso de la concentración de glucosa en plasma en ayunas, tanto en ratones delgados como en ratones obesos (Wu y col., 2010).

Otra proteína importante en la regulación de FoxO1 y, por lo tanto, en la regulación de la gluconeogénesis hepática es la desacetilasa Sirt1 (*silent information regulator 1*). Entre las funciones de esta proteína se encuentra la de activar o inhibir diferentes proteínas diana mediante la eliminación de grupos acetil de las mismas. Es el caso por ejemplo de FoxO1, ya que se ha visto cómo Sirt1 es capaz de desacetilar y activar a FoxO1 y, en consecuencia, de incrementar la transcripción de sus genes diana, promoviendo la gluconeogénesis y la liberación de glucosa desde los hepatocitos (Frescas y col., 2005). Es importante destacar que la actividad de Sirt1 es dependiente de la cantidad de NAD⁺ celular, coenzima sintetizado gracias a la proteína NAMPT (nicotinamida fosforibosiltransferasa) (Imai, 2011).

Estudios recientes han demostrado también cómo la proteína arginina metiltransferasa-1 (PMRT1) es capaz de regular el control hepático de la gluconeogénesis dependiente de FoxO1 (Han y col., 2014). Esta proteína transfiere grupos metil en residuos arginina a sus proteínas diana. De esta forma, se ha demostrado como PMRT1 modula la dimetilación de FoxO1 en sus residuos arginina 248 y 250 en el hígado de ratones, provocando una disminución en la capacidad que tiene la insulina de reducir la síntesis de glucosa en el hígado. Esto es debido a que estos grupos metil añadidos por PMRT1 en residuos arginina de la proteína diana, dificultan la fosforilación de los residuos serina adyacentes. De esta manera, se ha observado cómo una sobreexpresión de PMRT1 promueve un aumento en la gluconeogénesis en hepatocitos, mientras que una inhibición de esta proteína en ratones, reduce la síntesis de glucosa hepática ya que aumenta la fosforilación del residuo serina de FoxO1, lo que produce una menor entrada de este factor de transcripción en núcleo y una disminución de los genes gluconeogénicos en ratones (Han y col., 2014).

Por último, en los últimos años se ha estudiado el efecto que las cinasas PKA (*cAMP dependent protein kinase*) y SGK1 (*serum and glucocorticoid-induced protein kinase 1*) tienen sobre la fosforilación y la activación de FoxO1.

La primera de ellas, la cinasa PKA, se trata de un regulador de diversos procesos implicados en el crecimiento celular y el desarrollo. PKA se activa en estado de baja energía celular, cuando los niveles de cAMP son elevados, ya que esta molécula se une a la subunidad reguladora de PKA, lo que provoca la liberación de la subunidad catalítica, que ahora será capaz de fosforilar una gran variedad de sustratos, incluyendo canales iónicos, enzimas metabólicas y factores de transcripción. De esta manera, Lee y colaboradores (2011) demostraron, gracias al estudio en cultivos de células humanas, cómo PKA es capaz de fosforilar directamente a FoxO1 en varios residuos específicos, incluido el residuo serina²⁵⁶, que provoca la retención citosólica de este factor de transcripción y, por lo tanto, su inactivación.

Con respecto a SGK1, son varios los estudios que evidencian la relación entre la actividad de esta cinasa y la fosforilación de FoxO1. Además, se ha descrito la necesidad de que SGK1 sufra fosforilaciones en dos residuos específicos para ser activa completamente (Park y col., 1999). El primero de estos residuos es la treonina²⁵⁶, cuya fosforilación es dependiente de la vía Akt-PDK (Kobayashi y Cohen, 1999) y, por lo tanto, de la acción directa de la insulina. El segundo residuo

clave en la activación de SGK1 es la serina⁴²², diana del complejo mTORC2 (Laplante y Sabatini, 2009).

De esta manera, gracias a diferentes mecanismos, la insulina promueve la síntesis de glucógeno en el hígado (también en el músculo) e inhibe la síntesis de glucosa hepática, hechos que contribuyen a la reducción de los niveles de glucosa plasmática (figura II-6).

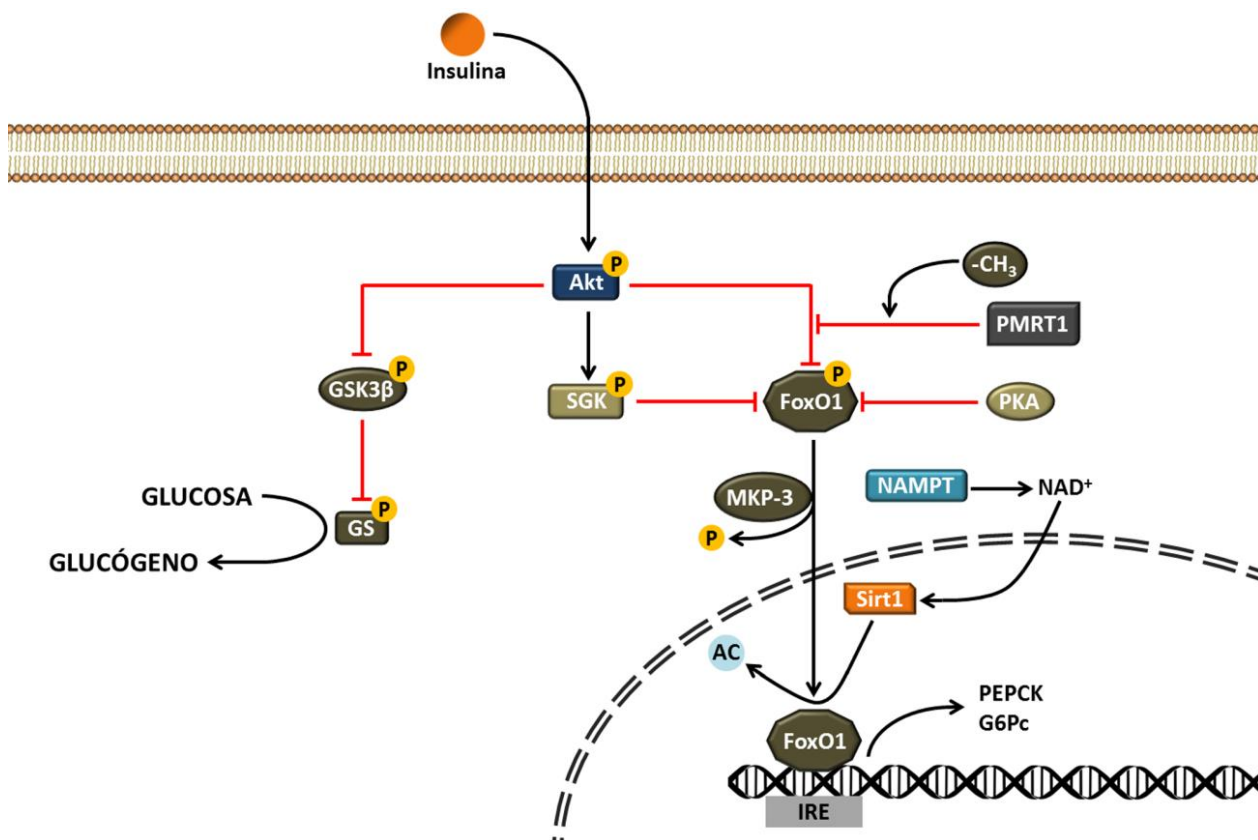


Figura II-6. Vía de señalización de la insulina en hígado. Implicación de la vía PI3K/Akt en el incremento de la síntesis de glucógeno y en la inhibición de la gluconeogénesis inducidos por insulina.

2.2.2.b) Activación de Akt en músculo esquelético: Importancia de GLUT4 y AS160

Los tejidos periféricos como músculo esquelético y tejido adiposo también tienen un papel importante en la regulación de la homeostasis de la glucosa dependiente de insulina. La entrada de glucosa en estos tejidos se da gracias al transportador GLUT4, que en condiciones basales se encuentra en vesículas citoplasmáticas. Sin embargo, tras una estimulación por insulina se produce la translocación de esta proteína hasta la membrana plasmática, mediante la fusión de las vesículas con la misma (Saltiel y Kahn, 2001).

Todo este proceso se produce gracias a la activación de la vía PI3K/Akt, anteriormente descrita, y a la participación de un sustrato de la cinasa Akt como mediador en la translocación de GLUT4. Se trata de la proteína AS160 (*Akt substrate of 160 kDa*), descrita inicialmente en cultivos de adipocitos pero que posteriormente se demostró que también jugaba un papel importante en

células musculares (Baus y col., 2008). Una estimulación por insulina, así como un fenómeno de contracción, provoca la fosforilación de AS160 en dos residuos (Serina⁵⁸⁸ y Treonina⁶⁴²) descritos como dianas de la cinasa Akt. Esta fosforilación es clave para la translocación de las vesículas de GLUT4 desde el citosol hasta la membrana plasmática y, por lo tanto, para la captación de glucosa plasmática por parte del músculo esquelético y del tejido adiposo en respuesta a la insulina (figura II-7).

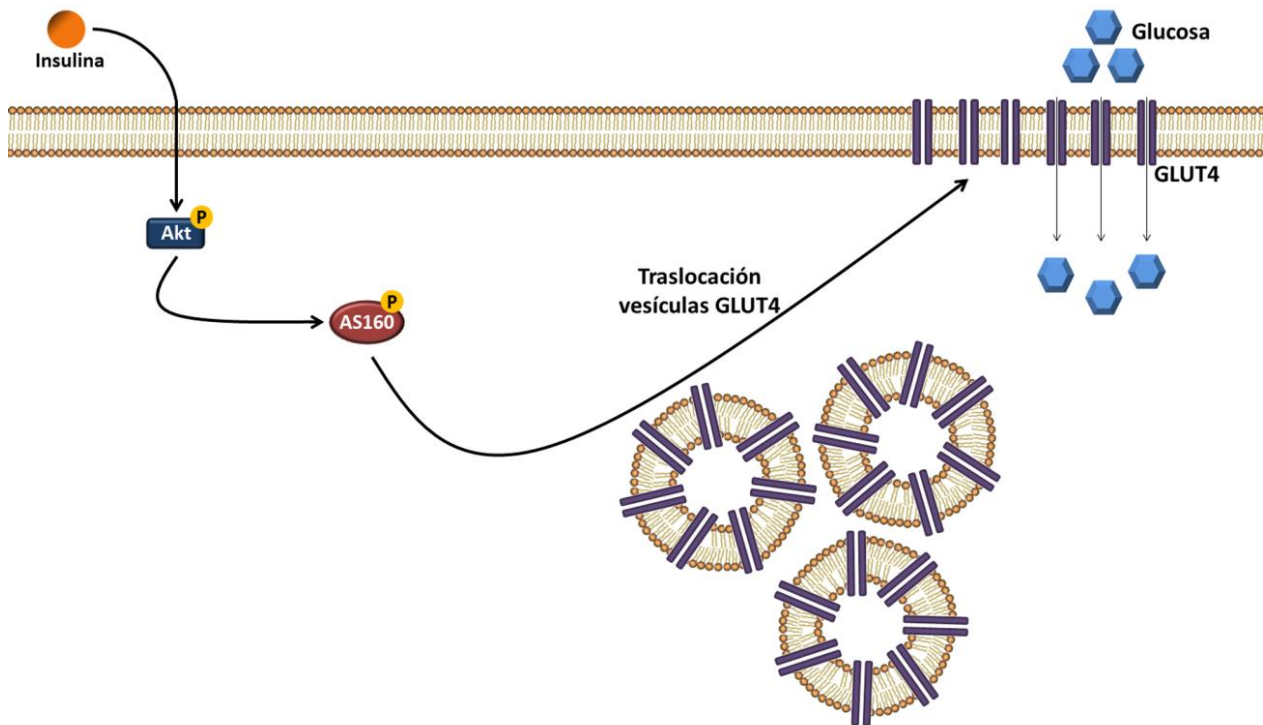


Figura II-7. Vía de señalización de la insulina en músculo esquelético. Implicación de la vía PI3K/Akt en la translocación de GLUT4 mediante AS160 como mecanismo de captación de glucosa plasmática.

Todo este fenómeno adquiere gran importancia en el músculo esquelético, ya que es el responsable de la captación del 75% de la glucosa circulante en plasma (Klip y Paquet, 1990). Karlsson y colaboradores (2005) demostraron cómo la activación de AS160 está reducida en pacientes con diabetes tipo 2, lo que comporta una disminución en la translocación de GLUT4. De esta forma, se recalca la importancia de un correcto funcionamiento en la vía de señalización por insulina en el músculo esquelético, ya que una alteración en cualquiera de las proteínas que forman parte de ella podría conducir a grandes alteraciones metabólicas.

2.2.2.c) Activación de Akt en tejido adiposo: Efecto sobre la lipogénesis y la lipólisis.

En el tejido adiposo, al igual que en el esquelético, también es importante la captación de glucosa en sangre a través de insulina. Sin embargo, en este tejido la principal función de la insulina es activar la lipogénesis e inhibir la lipólisis, provocando así un aumento de las reservas energéticas en forma de grasas y disminuyendo la liberación de ácidos grasos no esterificados (NEFAs) desde el tejido adiposo hacia la circulación en plasma.

En el caso de la lipogénesis, la insulina juega un papel importante en la síntesis de nuevos ácidos grasos. Por un lado, estimula la acción de la lipoproteína lipasa (LPL), localizada en la superficie del endotelio vascular, provocando la liberación de ácidos grasos presentes en las VLDL y quilomicrones (QM), que serán captados por el adipocito gracias a transportadores específicos, como FABP (*fatty acid binding protein*) o FAT (*fatty acid transporter*), ésta última conocida también como CD36. Por otro lado, la insulina se une a su receptor localizado en la superficie del adipocito y, gracias a la vía de señalización mediada por Akt, se produce la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana celular, lo que facilita la captación de glucosa al interior del adipocito, que mediante el proceso de glucólisis se transformará en glicerol-3-fosfato. De esta forma, gracias a la insulina, aumentan la disponibilidad de moléculas de ácidos grasos y glicerol-3-fosfato, que serán esterificadas hasta formar triglicéridos (Maeda y col., 2008) (figura II-8).

Por su parte, la lipólisis en el tejido adiposo también se encuentra bajo un estricto control hormonal, donde el glucagón y la insulina juegan papeles antagónicos. En estado de ayunas, el glucagón es capaz de activar la adenilato ciclasa (AC), que incrementa los niveles de cAMP intracelular y activa así a la PKA. La cinasa PKA fosforila a la lipasa sensible a hormona (HSL), causando la translocación de esta lipasa desde el citosol hasta su nueva localización celular, las gotas lipídicas donde se almacenan los triglicéridos, favoreciendo así la lipólisis de los mismos para la formación de ácidos grasos no esterificados (NEFAs) que se liberarán a la circulación sistémica. Durante un estado postabsortivo, la insulina se une a su receptor en el tejido adiposo e inicia así una cascada de señalización, entre la que se incluye la cinasa Akt, que inhibe la lipólisis. El efecto antilipolítico de la insulina está mediado principalmente a través de la fosforilación y activación de la fosfodiesterasa 3B (PDE3B), que disminuye los niveles de cAMP y, por consiguiente, la actividad de PKA. Este fenómeno se traduce en una disminución en la fosforilación de HSL, reduciendo así la actividad lipolítica (Choi y col., 2010) (figura II-8).

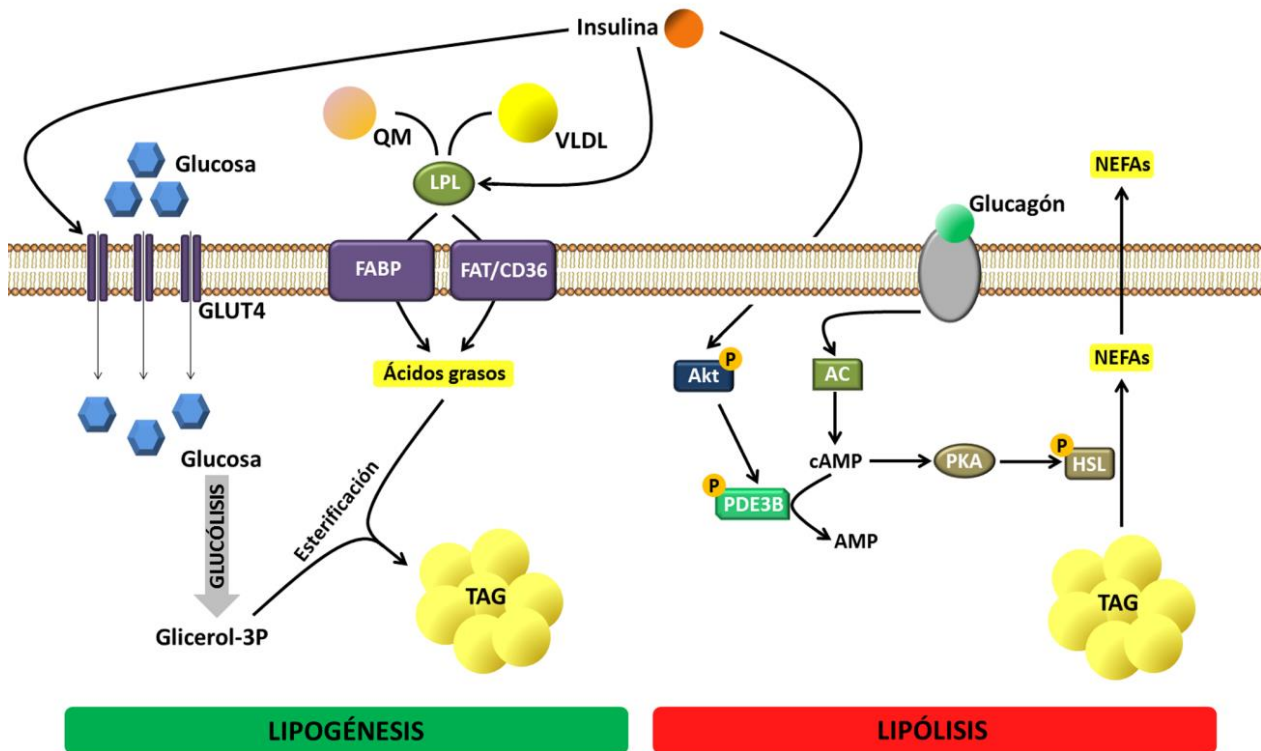


Figura II-8. Vía de señalización de la insulina en tejido adiposo. Mecanismo de acción de la insulina en la activación de la lipogénesis y en la inhibición de la lipólisis.

2.2.3) MAPKs y su papel en el metabolismo energético

La vía de señalización de las MAPKs (proteínas cinasas activadas por mitógenos) juega un papel importante a la hora de regular la expresión de diferentes genes en células eucariotas y sirve como enlace entre las señales extracelulares y la maquinaria celular que controla, fundamentalmente, procesos como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la migración y la apoptosis. Se conocen tres grupos principales de cascadas reguladas por MAPK en humanos que tienen como resultado cambios en la expresión génica: Erk1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) y p38 (*p38 MAPK*) (Munshi y Ramesh, 2013). Tras la activación de las MAPKs, diferentes factores de transcripción presentes en el citoplasma o núcleo son fosforilados y activados, aumentando así la expresión de diversos genes diana. Además, las MAPKs también pueden fosforilar y activar a otras proteínas cinasas diana, aumentando así las vías metabólicas reguladas por esta familia de cinasas y demostrándose la gran importancia reguladora de esta familia de proteínas (Munshi y Ramesh, 2013). Es por este motivo que un cambio en la regulación de las MAPKs puede conducir a algún tipo de alteración celular, que será capaz de contribuir a la aparición de cualquier efecto indeseable para el organismo, como inflamación, cáncer y también efectos metabólicos adversos.

II. INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Actualmente, son varios los estudios que han demostrado una relación entre las vías de las MAPKs y la aparición de resistencia a la insulina relacionada con la obesidad y también de diabetes tipo 2. Entre estas vías, cabe destacar aquellas en las que intervienen las cinasas Erk1/2, JNK y p38.

Por ejemplo, Jiao y colaboradores (2013) demostraron que una activación excesiva de la vía de Erk1/2 suprimía la expresión del gen gluconeogénico glucosa-6-fosfatasa, así como disminuía la producción y salida de glucosa en cultivo de células de hepatoma. Además, se demostró cómo un incremento en la actividad de la cinasa Erk1/2 en ratones obesos contribuía a la aparición de resistencia a la insulina. A partir de estos resultados, estos investigadores hipotizaron que la activación de la vía de Erk1/2 en el hígado estimulaba la síntesis de glucógeno, a la vez que atenúa la producción de moléculas de glucosa. Para ello, proponen que Erk1/2 es una cinasa capaz de fosforilar al factor de transcripción FoxO1, provocando un descenso en su translocación nuclear. Con estos resultados, se demuestra que la fosforilación de FoxO1 por Akt no es el único mecanismo por el cual FoxO1 queda retenido en el citosol.

Con respecto a JNK, Vallerie y colaboradores (2008) demostraron cómo la cinasa JNK1 participa en la fosforilación del residuo inhibitorio serina en IRS1. Esta fosforilación provoca un descenso en la vía de señalización de Akt, induciendo resistencia a la insulina, tanto en modelos celulares como en animales. Además, se destaca cómo una deficiencia en JNK1, pero no así en JNK2, resulta en una marcada protección contra la resistencia a la insulina y la hepatoesteatosis en individuos obesos. La cinasa JNK ha sido relacionada también con efectos adversos en diferentes modelos celulares y tejidos. Por ejemplo, en las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas una activación de JNK está implicada en la reducción de la expresión del gen de la insulina. Varios estudios también demuestran cómo una inhibición en la actividad de JNK1 en células de hígado, mediante el uso de agonistas para esta cinasa, provoca una disminución en los niveles circulantes de glucosa e insulina, a la vez que mejora la sensibilidad a la insulina en animales obesos (Nakatani y col., 2004; Yang y col., 2007). Por el contrario, la activación de JNK1 en músculo sólo produce un leve alteración en los niveles de glucógeno y de proteínas clave implicadas en el metabolismo de la glucosa, sugiriendo así que la actividad y el efecto de JNK1 son específicos en función del tejido en el que tenga lugar (Fujii y col., 2004; Witczak y col., 2006). Además de su papel en la regulación del metabolismo de la glucosa, también se ha propuesto a la cinasa JNK como posible diana de la proteína IRE1, que participa en la conocida como vía del estrés de retículo endoplasmático, y que será detallada más adelante (Sano y Reed, 2013).

Por último, Collins y colaboradores (2006) identifican a la cinasa p38 como responsable de la activación de la gluconeogénesis inducida por ácidos grasos libres (FFAs, *free fatty acids*). Este grupo de investigación demuestra, mediante el uso de cultivos primarios de hepatocitos, que las cadenas medias y largas de ácidos grasos (ya sean saturados o insaturados) pueden activar a la proteína p38, e incrementar así los niveles de RNA de la fosfoenolpiruvato carboxicinas y de la glucosa-6-fosfatasa. La expresión de estos genes gluconeogénicos puede ser bloqueada

mediante el uso de inhibidores de la cinasa p38. Gracias a estudios de Eijkelenboom y Burgering (2013) se deduce que el efecto de p38 sobre la gluconeogénesis es debido a la fosforilación de esta cinasa sobre un residuo activo en el factor de transcripción de FoxO1, favoreciendo así la expresión de *pepck* y de *g6pc*.

2.3) Inhibición de la vía de la insulina: Resistencia a la insulina

Se han identificado varias situaciones fisiopatológicas en las que la vía de señalización de la insulina puede verse alterada, provocando, si este fenómeno persiste en el tiempo, una resistencia a la insulina. En esta situación, una concentración normal de insulina no produce una respuesta adecuada en sus tejidos diana, como el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo. De esta manera, las células β del páncreas deben secretar más insulina con el objetivo de reducir la glucemia. Esto es así hasta que llega el momento en el que estas células son incapaces de secretar suficiente insulina para disminuir el aumento de glucosa en plasma, por lo que se produce un estado de hiperglucemia y de diabetes de tipo 2. Se han descrito diferentes mecanismos moleculares que podrían explicar un déficit en la señalización de la vía de la insulina.

En primer lugar, una reducción de la expresión o un incremento de la degradación de componentes clave en la vía de señalización de la insulina pueden provocar resistencia a la insulina. Por ejemplo, se ha demostrado que en ratones *ob/ob* la expresión del mRNA que codifica para IRS2 está disminuida, así como los niveles de la propia proteína, lo que provoca una reducción en la activación de Akt y una aparición de resistencia a la insulina (Shimomura y col., 2000).

Otro mecanismo inhibitorio de la vía de la insulina es aquel que se basa en fosforilaciones inhibitorias en algún componente de la vía. Además de la fosforilación activadora en residuos tirosinas, tanto el receptor de insulina como las proteínas IRS pueden sufrir fosforilaciones inhibitorias en residuos serinas, lo que provoca una disminución de la señalización de la vía de la insulina (Saltiel y Kahn, 2001). Estas fosforilaciones negativas proporcionan un *feedback* negativo en la señalización por insulina y sirven como mecanismo de unión con otras vías metabólicas que pueden provocar resistencia a esta hormona. Diversas cinasas se han visto implicadas en este proceso, como es el caso por ejemplo de mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Recientes estudios sugieren que la obesidad inducida por la atenuación de la señalización de la insulina es debida a una activación secuencial de la cinasa PKC (*protein kinase C*) y de la cinasa del inhibidor del factor nuclear κ B (I κ B), aunque los detalles de estas vías todavía no han sido bien determinados (Kim y col., 2001).

La acción de la insulina también puede verse atenuada por la acción de las proteínas fosfatasa tirosinas (PTPasas), que catalizan de una manera muy rápida la desfosforilación del receptor de la insulina y de sus sustratos. Dentro de esta familia de proteínas, la más estudiada es la proteína fosfatasa 1B (PTP1B). Se ha observado que ratones deficientes para esta proteína

presentaban unos niveles mayores de fosforilación en residuos tirosina del receptor de la insulina y de las proteínas IRS en músculo e hígado, mejorando la sensibilidad a la insulina (Elchebly y col., 1999). También cabe destacar el papel de otras fosfatasas como PTEN (*phosphatase and tensin homologue*), capaz de desfosforilar el PIP3. De esta forma, se ha demostrado cómo la supresión de esta fosfatasa mejora la sensibilidad a insulina y el control de la glucemia (Schinner y col., 2005).

Otro mecanismo que puede conducir a un estado de resistencia a la insulina es la interacción de proteínas inhibitoras con componentes de la vía de señalización. Es el caso de las proteínas SOCS (*supressors of cytokine signaling*), la expresión de las cuales se induce en respuesta a diversas citocinas. Estas proteínas bloquean la vía de señalización de la insulina mediante su unión y bloqueo al receptor de insulina y a las proteínas IRS, provocando además la degradación de estas últimas (Emanuelli y col., 2000).

2.3.1) Resistencia a la insulina inducida por miRNAs: Papel de miRNA-33a/b

Dentro del mundo de los RNAs no codificantes, los microRNAs (o miRNAs) son pequeñas moléculas de unos 22 nucleótidos de cadena sencilla que actúan como reguladores de la expresión de determinados genes a nivel postranscripcional. Conservados a lo largo de diferentes especies animales, plantas, e incluso virus, los miRNAs ejercen su función mediante el reconocimiento complementario en sus secuencias diana de mRNA. Este fenómeno resulta en una disminución en la traducción y en la expresión de los genes que regulan, debido a una represión traduccional, a una alteración en la estabilidad del mRNA, o a ambos procesos a la vez. Sin embargo, aunque rara, también es posible una regulación positiva de algunos genes por parte de los miRNAs (Panera, 2014).

Hasta la fecha, se estima que estas pequeñas cadenas de nucleótidos regulan aproximadamente el 30% del genoma humano, y están consideradas como reguladores clave de una gran variedad de procesos celulares, como la proliferación, la apoptosis, la diferenciación y el crecimiento celular. El genoma humano codifica para cientos de miRNAs, clasificados como intergénicos, intrónicos o exónicos. Independientemente de su localización genómica, los genes de microRNAs se encuentran como genes aislados o como clúster de genes, bajo el control de su propia región promotora o de la región promotora de genes que codifican para proteínas (Panera, 2014). Los miRNAs son procesados como transcritos primarios en el núcleo y en el citoplasma, mediante la acción secuencial de los enzimas Drosha y Dicer, respectivamente. Una vez en el citoplasma, los miRNAs maduros se incorporan al complejo silenciador inducido por RNA (RISC, de sus siglas en inglés) y se unen por complementariedad de sus bases a los genes diana.

Se ha descrito cómo numerosos miRNAs están implicados en el control de la señalización de insulina y del metabolismo de la glucosa en múltiples niveles, además de regular el metabolismo lipídico. Es el caso del miR-33a y del miR-33b, microRNAs intrónicos que se encuentran

localizados dentro de los genes que codifican para los factores de transcripción SREBP-2 y SREBP-1, respectivamente (Dávalos y col., 2011). De esta forma, se ha descrito el papel de estos dos miRNAs en la regulación del metabolismo de ácidos grasos y de la señalización por insulina. Efectivamente, se ha observado cómo los nucleótidos miR-33a/b son capaces de inhibir la expresión de la proteína IRS2 en células hepáticas, reduciendo así la activación de las vías metabólicas que dependen de esta hormona, como es el caso de AKT y ERK. Además, estos dos miRNAs también reconocen como diana a mRNAs que codifican para genes que regulan la oxidación de ácidos grasos, como es el caso de la carnitina palmitoiltransferasa1 (CPT1), de la hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HCDH) y de la cinasa AMPKa (proteína cinasa activada por AMP, subunidad α).

Este mismo grupo de investigación demuestra cómo una sobreexpresión de miR-33a y miR-33b reduce, tanto la oxidación de ácidos grasos, como la señalización por insulina en células hepáticas. Por el contrario, el uso de antagonistas para las moléculas endógenas de miR-33a/b provoca un aumento en estas dos vías metabólicas, evidenciándose así el gran potencial terapéutico de estos antagonistas en el tratamiento del síndrome metabólico.

Se ha observado cómo durante el procesamiento del miRNA-33, se forman dos cadenas transitorias denominadas *3p miRNA-33* y *5p miRNA-33*, que pueden seguir una regulación diferencial. Lo más normal es que la segunda forma sea degradada permaneciendo la primera, aunque también puede darse el caso de que ambas sean eliminadas o perduren en la célula. En este último caso, son varios los estudios que demuestran que ambas cadenas pasajeras presentan como gen diana a aquel que codifica para la proteína IRS2 (Goedeke y col., 2013).

3) SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS: LIPOGÉNESIS

La lipogénesis *de novo* (DNL), o la síntesis de ácidos grasos (AG) *de novo*, es un proceso metabólico que sintetiza ácidos grasos a partir de un exceso de carbohidratos provenientes de la dieta. Estos ácidos grasos pueden ser incorporados después a la síntesis de triglicéridos (TAG), como mecanismo de almacenaje de energía. En condiciones normales, la DNL tiene lugar en los conocidos como tejidos lipogénicos, entre los que se encuentran el hígado y el tejido adiposo. Esta vía está considerada como una vía minoritaria de la entrada de triglicéridos en plasma, ya que el mayor aporte de éstos tiene lugar a partir de la dieta. Sin embargo, son numerosos los estudios que sugieren que una síntesis hepática de nuevos ácidos grasos, puede contribuir significativamente al contenido lipídico en plasma de individuos con una alta ingesta de carbohidratos (Ameer y col., 2014).

El flujo de carbonos desde la glucosa hasta los ácidos grasos, modulado por la vía lipogénica, incluye una serie de reacciones enzimáticas muy bien coordinadas. Un fallo en la regulación de esta vía está asociado a la aparición de alteraciones metabólicas. De esta forma, un exceso en la síntesis y en el almacenaje de TAG debido a una ingesta calórica superior al gasto calórico conlleva a la aparición de obesidad, una epidemia de salud global en la actualidad que está altamente relacionada, como ya se ha mencionado anteriormente, con resistencia a la insulina, esteatosis hepática, dislipemia y enfermedades cardiovasculares (Wong y Sul, 2010).

Como resultado de la lipogénesis, los triglicéridos sintetizados en el hígado se utilizan para la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que se liberan a la sangre para que el resto de tejidos, tras una reacción de hidrólisis, obtengan los ácidos grasos presentes en ellas (figura II-9).

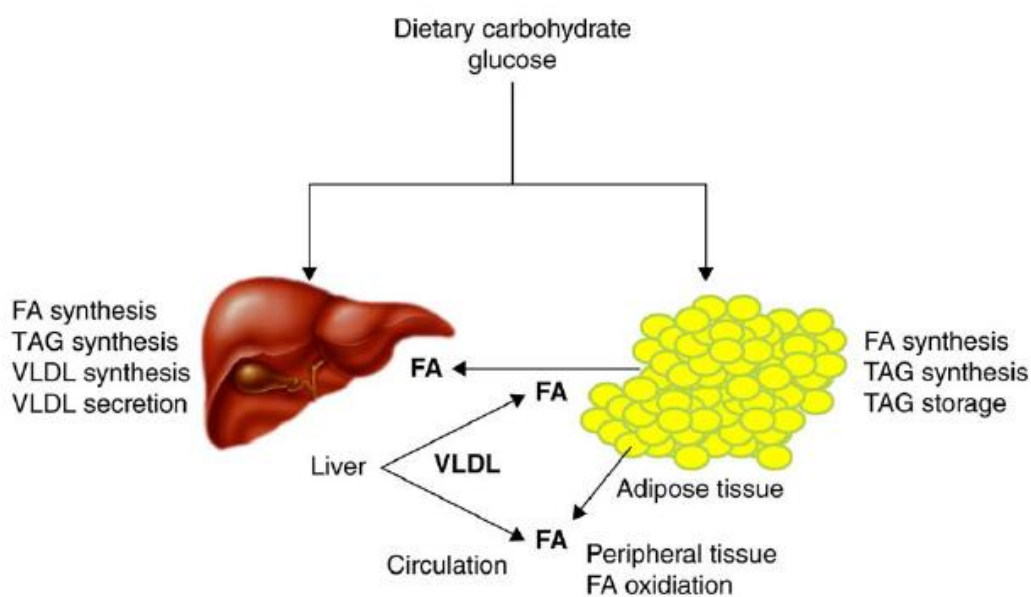


Figura II-9. Esquema representativo del flujo lipídico entre los dos tejidos lipogénicos (hígado y tejido adiposo) tras una ingesta elevada de carbohidratos. Imagen obtenida de Wong y Sul (2010). FA: ácido graso, TAG: triglicérido, VLDL: lipoproteína de muy baja densidad.

Los carbohidratos provenientes de la dieta entran al interior del hígado y del tejido adiposo, donde son metabolizados mediante el proceso de la glucólisis, que tiene como resultado final la formación de piruvato. Este piruvato, gracias al enzima piruvato deshidrogenasa (PDH), se transformará en moléculas de acetyl-CoA que entrarán en la mitocondria para incorporarse al ciclo de Krebs, mediante el cual se obtendrán moléculas de citrato. Este citrato saldrá de la mitocondria y en el citoplasma volverá a transformarse en acetyl-CoA gracias al enzima ATP citrato liasa (ACL), para que comience así la vía de la lipogénesis. Otro posible destino de este piruvato es la formación de ácido láctico mediante la lactato deshidrogenasa (LDH), que cataliza esta reacción de metabolismo energético anaeróbico (figura II-10).

En caso de un exceso de aporte de glucosa, además de por la glucólisis, ésta también puede ser metabolizada mediante la conocida como vía de las pentosa fosfato para generar poder reductor en forma de moléculas de NADPH. El enzima limitante en este proceso es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), que cataliza la primera reacción de dicha vía, transformando la glucosa-6-fosfato, formada tras el primer paso de la glucólisis, en fosfogluconolactona. Además, a partir de glucosa-6-fosfato y gracias al enzima fosfoglucomutasa también se puede obtener glucógeno, una forma de almacenamiento de glucosa intracelular.

Así, el acetyl-CoA resultante de la vía de la glucólisis y del ciclo de Krebs se transforma en malonil-CoA por la acción del enzima acetyl-CoA carboxilasa (ACC). A continuación, el enzima ácido graso sintasa (FAS) convierte el malonil-CoA en palmitato. La molécula de palmitato, un ácido graso saturado (SFA), es el mayor producto de la lipogénesis, aunque como resultado de esta vía metabólica también se forman moléculas de estearato y ácidos grasos de cadena corta (Ameer y col., 2014).

El palmitato formado por la lipogénesis puede sufrir un proceso de esterificación, gracias al cual este ácido graso acaba formando parte de los triglicéridos presentes en las lipoproteínas circulantes en sangre. Para ello, el enzima esteroil-CoA desaturasa 1 (SCD1) se encarga de catalizar la conversión de palmitato, un ácido graso saturado, en ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs). Tras la acción del enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), que se encarga de incorporar ácidos grasos a la molécula de glicerol, se obtiene como producto el diacilglicerol (DAG). Finalmente, este DAG servirá de sustrato al enzima diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), esencial para la síntesis de triglicéridos, que serán empaquetados en forma de partículas VLDL y liberados a la circulación (figura II-10).

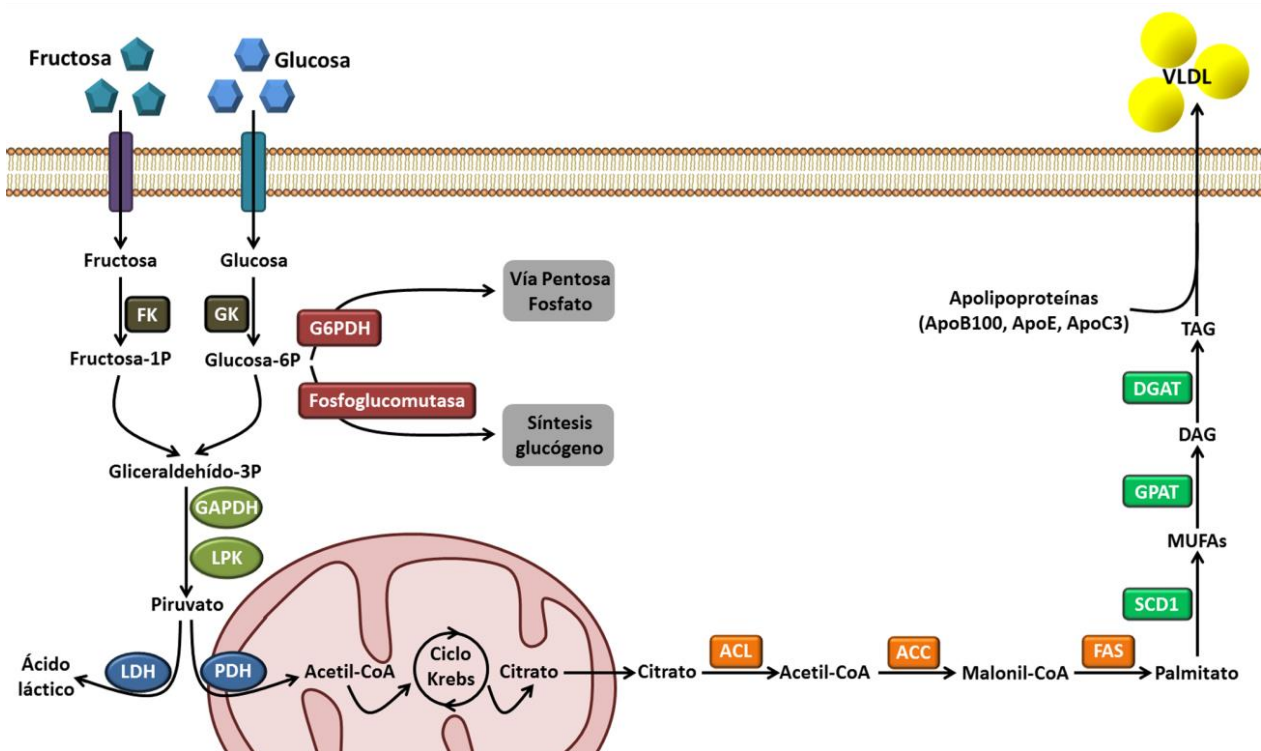


Figura II-10. Glucólisis y síntesis hepática de triglicéridos a partir de carbohidratos procedentes de la dieta.

3.1) Regulación génica de la lipogénesis

En humanos, la vía de la lipogénesis es activa, sobre todo, en los dos tejidos de mayor actividad metabólica: el hígado y el tejido adiposo. Sin embargo, se ha demostrado que la lipogénesis hepática es cuantitativamente más eficiente que la que tiene lugar en el tejido adiposo. De hecho, la expresión del gen *fas*, considerado como un marcador principal de la lipogénesis, presenta unos niveles muy elevados en el hígado (Ameer y col., 2014).

La actividad de la lipogénesis *de novo* se ve influenciada, entre otros factores, por la dieta. Se ha demostrado cómo dietas ricas en carbohidratos son capaces de activar la lipogénesis en hígado, a la vez que incrementan la síntesis y la secreción de VLDL, provocando así un estado de hipertrigliceridemia. Además, se ha demostrado que no sólo la cantidad, sino también el tipo de carbohidrato consumido afecta a la actividad de la lipogénesis. En concreto, se ha identificado a la fructosa como un monosacárido que ejerce un potente efecto sobre esta vía (Ameer y col., 2014). Del mismo modo, se ha estudiado cómo los azúcares simples son mucho más efectivos a la hora de estimular la lipogénesis hepática que los carbohidratos complejos (Hudgins y col., 1998; Parks y col., 1999). Además, la lipogénesis en el tejido adiposo presenta una menor actividad que la hepática como resultado de una ingesta prolongada de carbohidratos (Diraison y col., 2003).

Los niveles de glucosa plasmática están directamente asociados con la captación de glucosa por parte de estos dos tejidos y pueden estimular la lipogénesis de varias maneras. En primer lugar, la glucosa proporciona los átomos de carbono necesarios para la síntesis de ácidos grasos. Para

ello, las moléculas de glucosa se metabolizan en la vía de la glucólisis hasta formar piruvato, que posteriormente, y gracias al ciclo de Krebs, se transformará en citrato, sustrato del cual se obtendrán las moléculas de acetil-CoA necesarias para la lipogénesis (Ameer y col., 2014).

Por otro lado, la glucosa induce la expresión de enzimas involucrados en la vía lipogénica. Este efecto de la glucosa en la expresión de genes lipogénicos es regulado a través del factor de transcripción ChREBP (*carbohydrate responsive element binding protein*), que se activa en respuesta a la glucosa. Esta activación comporta la translocación de ChREBP hacia el núcleo, donde se unirá a regiones promotoras conocidas como ChoREs (*carbohydrate responsive elements*) en los genes diana que controla, mediando así su transcripción (Herman y col., 2012).

Por último, los niveles de glucosa en plasma afectan también a la expresión de genes de la vía lipogénica mediante la estimulación de insulina y la inhibición de glucagón por parte del páncreas. El efecto de la insulina en la expresión de genes lipogénicos está controlado a través de la proteína SREBP-1 (*sterol regulatory element binding protein-1*) en células hepáticas y adipocitos. La insulina activa a SREBP-1, tanto de manera transcripcional como postraduccional, lo que provoca su migración desde el retículo endoplasmático hasta el núcleo, donde se une a regiones promotoras de los genes diana que controla, para aumentar así la transcripción de los mismos (Kersten, 2001).

3.1.1) Factor de transcripción ChREBP

El factor de transcripción ChREBP está considerado como el mayor factor de transcripción en respuesta a glucosa en el hígado. La glucosa es capaz de activar ChREBP mediante la estimulación de su expresión, gracias a la regulación de su entrada en el núcleo desde el citosol y a través la facilitación de su unión con las regiones ChoRE presentes en las regiones promotoras de los genes glucolíticos y lipogénicos. Cuando las concentraciones de glucosa son bajas, ChREBP se localiza en el citoplasma, pero tras un aumento en los niveles de glucosa, este factor de transcripción migra a núcleo (Kawaguchi y col., 2001). En condiciones basales, con un bajo aporte de glucosa en la célula y con una alta concentración de cAMP, ChREBP se encuentra fosforilado en el residuo serina¹⁹⁶ gracias a la proteína cinasa A, lo que implica su retención citosólica. Frente a una concentración elevada de glucosa, se genera un metabolito de la vía de las pentosa fosfato, la xilulosa-5-fosfato, que se ha descrito como responsable de la activación específica de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Ferré y Foufelle, 2010). Una vez activa, PP2A desfosforila a ChREBP en este residuo serina¹⁹⁶, permitiendo así la entrada de éste al núcleo. Allí, ChREBP sufre una segunda desfosforilación dependiente también de PP2A, esta vez en el residuo treonina⁶⁶⁶, que permite la unión de ChREBP a las regiones ChoRE y, por lo tanto, la activación de la transcripción de sus genes diana (Postic y col., 2007) (figura II-11). Este mismo grupo de investigación, ha descrito cómo el metabolito glucosa-6-fosfato (y no la xilulosa-5-fosfato) obtenido a partir de la acción de la glucocinasa, es la molécula clave en la regulación de la translocación nuclear de ChREBP en respuesta a altos niveles de glucosa en las células hepática (Dentin y col., 2012).

Mediante experimentos *in vitro* de inhibición de ChREBP se han determinado algunos genes que presentan regiones ChoRE en su zona promotora y cuya regulación transcripcional depende de este factor de transcripción. Es el caso de los genes que codifican para las proteínas LPK (piruvato cinasa hepática), ACC, FAS, SCD1 y GPAT, importantes en la vía de la glucólisis y de la lipogénesis (Glimcher y Lee, 2009).

Se ha relacionado a ChREBP con diversas alteraciones metabólicas, como la diabetes, la obesidad, la esteatosis hepática y la hiperlipemia. Por ejemplo, se ha observado que la expresión génica y el contenido nuclear de ChREBP se encuentran fuertemente incrementados en ratones *ob/ob*. Además, en estos ratones la inhibición de ChREBP en el hígado disminuye de forma significativa la lipogénesis y la esteatosis hepática, así como la concentración de triglicéridos y de ácidos grasos no esterificados en el plasma. Por último, la hiperglucemia y la hiperinsulinemia también resultaron reducidas como resultado de esa inhibición de ChREBP, mejorando de esta forma la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa (Dentin y col., 2006).

Recientemente, se ha demostrado cómo una sobreexpresión de ChREBP en hígado de ratones protege frente a un estado de resistencia a la insulina (Benhamed y col., 2012). Esta sobreexpresión hepática de ChREBP también induce resistencia frente a fenómenos de inflamación. Estos datos son sorprendentes, ya que estos animales presentaban una elevada esteatosis hepática, debida a un aumento en la actividad del enzima SCD1, y aun así, se encontraban protegidos frente a un estado de resistencia a la insulina.

3.1.2) Factor de transcripción SREBP-1c

El factor de transcripción SREBP-1c, al igual que ChREBP, pertenece a la familia de factores de transcripción bHLH-LZ (*basic-helix-loop-helix-leucine zipper*). SREBP-1c se trata del mayor regulador de la vía lipogénica, mientras que las isoformas SREBP-2 y SREBP-1a están implicadas en la regulación de la transcripción de genes relacionados con la síntesis de colesterol (Ferré y Foufelle, 2010).

La expresión de SREBP-1c está transcripcionalmente controlada por varios factores, tanto nutricionales como hormonales, entre los que la insulina se comporta como uno de los más relevantes. Se ha observado cómo en cultivos de hepatocitos la insulina activa la transcripción de SREBP-1c, mientras que el glucagón la inhibe (Foretz y col., 1999; Shimomura y col., 1999). SREBP-1c se sintetiza como precursor inactivo y se une a las membranas del complejo aparato de Golgi - retículo endoplasmático. Para la activación de SREBP-1c, es necesario un corte proteolítico que libere la forma madura del retículo endoplasmático, para que ésta pueda llegar al núcleo y ejercer su acción como factor de transcripción, gracias al reconocimiento de las secuencias SRE (*SREBP response element*) en los genes diana. En el núcleo, la forma madura de SREBP-1c está sujeta a diversas modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, la

acetilación o la ubiquitinización, que regulan la estabilidad y la actividad transcripcional del factor de transcripción activo (Ferré y Foufelle, 2010) (figura II-11).

Encontramos una gran variedad de genes regulados por el factor de transcripción SREBP-1c. Es el caso del gen de la glucocinasa, enzima que participa en una etapa muy inicial de la glucólisis. Los proteínas lipogénicas FAS y ACC también se encuentran sobre la regulación transcripcional por parte de SREBP-1c, al igual que los genes que codifican para la SCD1 y GPAT, y que participan en la síntesis de triglicéridos (Ferré y Foufelle, 2010).

Debido a la importancia en el metabolismo de carbohidratos y lípidos de estos genes regulados por SREBP-1c, son numerosos los estudios que relacionan a este factor de transcripción con fenómenos de esteatosis hepática o resistencia a la insulina. Por ejemplo, Shimomura y colaboradores (2000) demostraron una mayor expresión de SREBP-1c en hígado en diversos modelos de resistencia a la insulina, mientras que Yahagi y colaboradores (2002) describieron que la disrupción del gen SREBP-1c en ratones *ob/ob* mejora la esteatosis hepática.

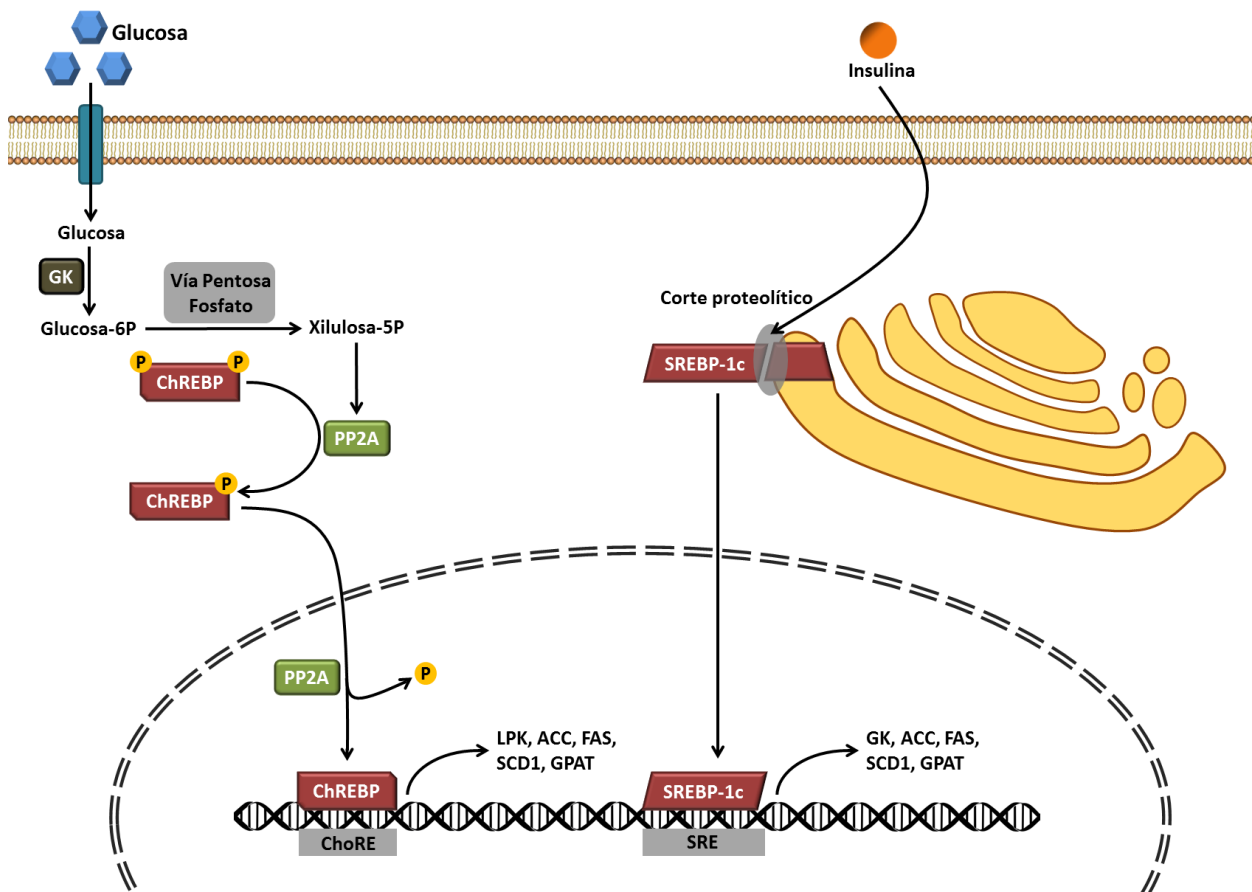


Figura II-11. Regulación de la expresión de genes implicados en la lipogénesis por los factores de transcripción ChREBP y SREBP-1c, y su relación con el metabolismo de la glucosa y la insulina.

4) OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS: β -OXIDACIÓN

El proceso conocido como β -oxidación de los ácidos grasos es un proceso de catabolismo a partir del cual se degradan moléculas de ácidos grasos para la obtención de energía. Para ello, en cada ciclo de la β -oxidación, dos átomos de carbono de la larga cadena del ácido graso sufren un proceso de oxidación, hasta la obtención de una molécula de acetil-CoA, que entrará en el ciclo de Krebs para la producción de moléculas de NADH y de FADH₂, que serán necesarias para la obtención de moléculas de ATP. Este proceso se da principalmente en el interior de la mitocondria y, en menor medida, en los peroxisomas.

Para que tenga lugar la β -oxidación primero es necesaria la entrada de ácidos grasos desde el plasma hasta el interior de la célula, fenómeno que se da gracias a la presencia del transportador de ácidos grasos FAT/CD36 y de la proteína de unión a ácidos grasos (FABP), que permiten la entrada de ácidos grasos circulantes en sangre que se obtienen tras la acción de la lipoproteína lipasa sobre las VLDL y quilomicrones remanentes presentes en el plasma (Lopaschuk y col., 2010). Una vez en el interior de la célula, y gracias a la acción del enzima acil-CoA sintetasa (ACS), los ácidos grasos se activan en derivados de acil-CoA. Estas moléculas de acil-CoA pasan al interior de la mitocondria gracias a un sistema complejo de transporte en el que participan tres proteínas. En primer lugar, la proteína CPT1 (*carnitine palmitoyltransferase-1*), situada en la membrana externa de la mitocondria transforma estos derivados de acil-CoA en moléculas de acilcarnitina. A continuación, la proteína carnitina translocasa (CT) permite la entrada de las moléculas de acilcarnitina al interior de la mitocondria, a la vez que se produce la salida de moléculas de carnitina. Por último, la proteína CPT2 (*carnitine palmitoyltransferase-2*), situada en la membrana interna de la mitocondria, transforma de nuevo las moléculas de acilcarnitina en derivados activos de acil-CoA, que son liberados al lumen mitocondrial. Ya en el interior de la mitocondria, las largas cadenas de acil-CoA entran finalmente en la vía de la β -oxidación, que tiene como resultado una molécula de acetil-CoA por cada ciclo de oxidación. En esta vía de oxidación de moléculas de acil-CoA cabe destacar el papel de la acil-CoA deshidrogenasa (ACAD), que cataliza el primer paso de este proceso; y de la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HCDH), productora de moléculas de NADH.

Las moléculas de acetil-CoA formadas como resultado de la β -oxidación entrarán en el ciclo de Krebs para la obtención de NADH y FADH₂, y para la síntesis de moléculas de ATP en la cadena transportadora de electrones (figura II-12) (Lopaschuk y col., 2010).

Todo este proceso tiene lugar en la mitocondria, aunque tal y como se ha mencionado anteriormente, el fenómeno de la β -oxidación también se da, aunque en menor medida, en el peroxisoma. En este orgánulo, la oxidación de ácidos grasos es importante para aquellas cadenas largas, muy largas o ramificadas de ácidos grasos, y el enzima clave en este proceso es la proteína conocida como acil-CoA oxidasa (ACO) (Burri y col., 2010).

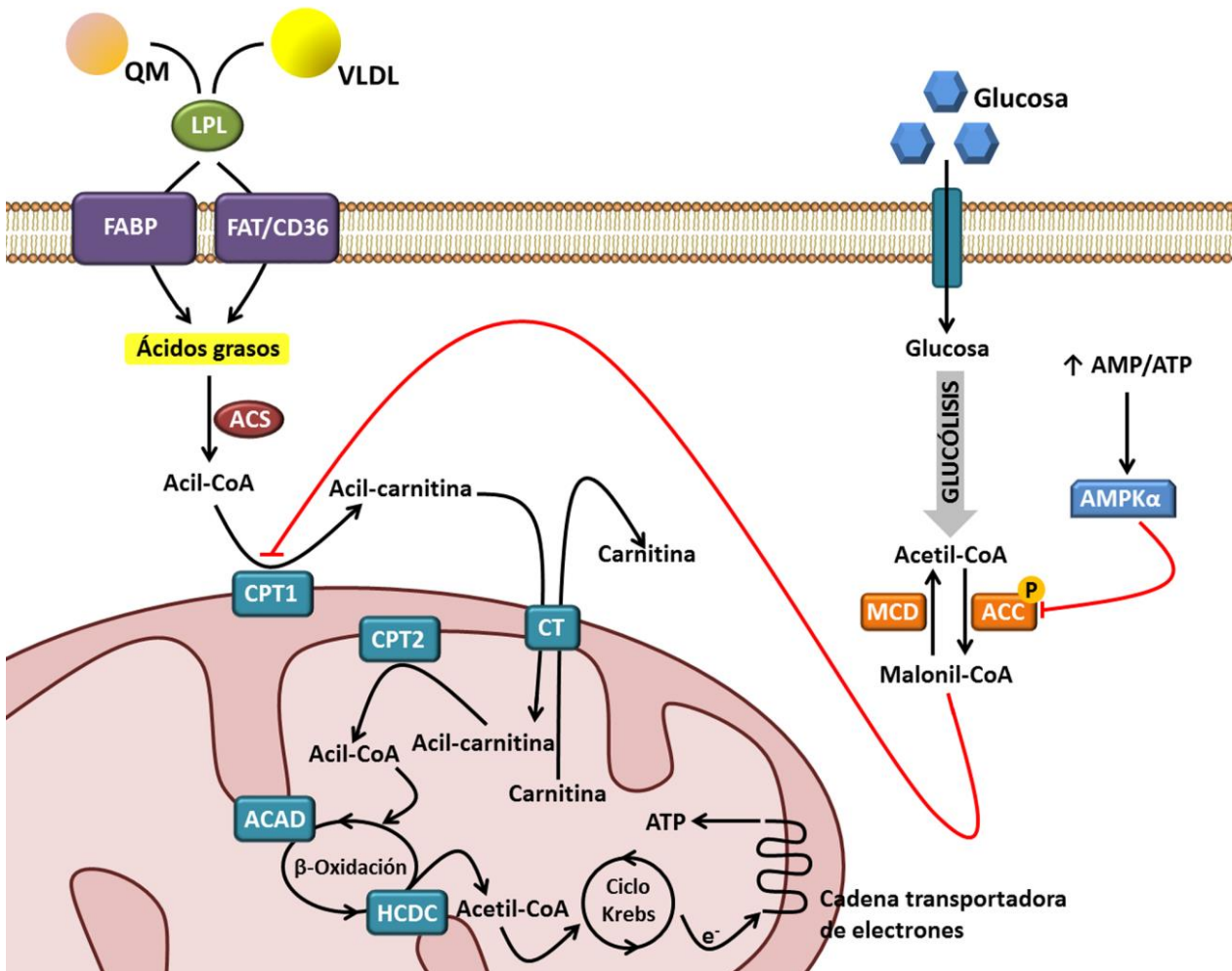


Figura II-12. Vía de la β -oxidación de ácidos grasos en hígado y participación de genes diana regulados por el factor de transcripción PPAR α .

La mayoría de proteínas descritas hasta ahora que participan en el proceso de la β -oxidación se encuentran reguladas por el factor de transcripción PPAR α , que adquiere una gran importancia en el metabolismo de lípidos dentro de la célula.

4.1) Regulación transcripcional de la β -oxidación: PPAR α

Los ácidos grasos de larga cadena son capaces de regular el metabolismo energético gracias a su acción como ligandos de la familia de receptores nucleares conocida como PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*). Las proteínas PPAR forman un heterodímero con el receptor X de retinoides (RXR) y se unen a secuencias específicas en el DNA conocidas como PPRE (*peroxisome proliferator response element*), presentes en los genes diana que regulan (Nakamura y col., 2014).

II. INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Existen 3 subtipos de PPARs codificados por genes diferentes: (i) PPAR α , codificado por el gen *nr1c1*, que se expresa principalmente en tejidos con alta capacidad para oxidar los ácidos grasos, como por ejemplo el hígado, el músculo esquelético, el corazón, el riñón y el intestino. (ii) PPAR β/δ , codificado por el gen *nr1c2*, que presenta una expresión muy ubicua, pero los niveles más altos de este subtipo se encuentran en músculo esquelético y en tejido adiposo. (iii) PPAR γ , codificado por el gen *nr1c3*, que se expresa principalmente en tejido adiposo y células inmunes (Nakamura y col., 2014).

Debido a su abundante expresión en el hígado y a la importancia que ejerce sobre el metabolismo de lípidos en este tejido, el presente trabajo se ha centrado en el estudio del factor de transcripción PPAR α , así como en las posibles alteraciones que pueda causar la ingesta de fructosa sobre las vías metabólicas y las proteínas que éste regula.

PPAR α ejerce un control muy intenso sobre el proceso de la β -oxidación, ya que muchos genes que participan en esta vía están regulados por este factor de transcripción. Es el caso de las proteínas FABP y FAT/CD36, que permiten la entrada de ácidos grasos al interior de la célula. El enzima responsable de la formación de derivados activos de acil-CoA, la proteína ACS, también está regulada por PPAR α , al igual que las proteínas CPT1 y CPT2, que participan en la entrada de estas moléculas de acil-CoA en la mitocondria. Dentro de este orgánulo, las moléculas de acil-CoA sufren el proceso de β -oxidación mediante proteínas como la ACAD o la HCDH, reguladas también por PPAR α (Purohit y col., 2009).

Además, PPAR α es responsable de la regulación de la proteína ACO, que se encarga de la β -oxidación en los peroxisomas, así como de la expresión del enzima malonil-CoA deshidrogenasa (MCD), responsable del paso de malonil-CoA a acetil-CoA (Purohit y col., 2009). Fuera de la célula participan igualmente proteínas de gran importancia para el metabolismo lipídico y que también son reguladas por PPAR α . Es el caso de la LPL, que reconoce las partículas de VLDL para la obtención de ácidos grasos que entrarán al interior de la célula para ser metabolizados. En concreto, la acción hidrolasa de la lipoproteína lipasa está estimulada por la presencia de la apolipoproteína APOA5, presente en las partículas VLDL y cuya expresión depende de PPAR α (Burri y col., 2010). De esta forma, se hace evidente la importancia de este factor de transcripción también en el metabolismo de lipoproteínas.

Por último, además de la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal, podemos encontrar la ω -oxidación, que tiene lugar en el retículo endoplasmático liso y en los microsomas y que se da gracias a los enzimas de la familia citocromo P450 omega hidroxilasa (CYP4A), regulados éstos también por PPAR α (Purohit y col., 2009).

Debido a la gran cantidad de genes importantes para el metabolismo lipídico regulados por PPAR α , son muchos los estudios que se han realizado hasta la fecha para analizar la relación entre una alteración del funcionamiento normal de PPAR α y la aparición de alguna alteración metabólica. Por ejemplo, Kersten y colaboradores (1999), demostraron cómo una dieta rica en grasa provocaba la aparición de esteatosis hepática en ratones deficientes para PPAR α . Además,

cuando estos ratones eran alimentados con una dieta deficiente en metionina y en colina, esta esteatosis empeoraba hasta la obtención de un cuadro de esteatohepatitis (Ip y col., 2003). Estos resultados ponen de manifiesto el papel clave de PPAR α en el desarrollo de esteatosis hepática, ya que demuestran cómo una deficiencia en este factor de transcripción es la responsable de la aparición de esta alteración en hígado.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, PPAR α regula la lipoproteína lipasa, responsable de la hidrólisis de los ácidos grasos de las VLDL, que serán captados por la célula. De esta forma, se ha demostrado cómo una activación de PPAR α provoca una bajada en los niveles de TAG en plasma, aumentando además las concentraciones de partículas HDL y reduciendo el riesgo de aterosclerosis en humanos (Birjmohum y col., 2005).

La vía de señalización de la leptina también juega un papel clave en la regulación de la β -oxidación. Estudios previos en nuestro laboratorio, realizados con ratas macho a las cuales se les había administrado fructosa al 10% (p/v) en el agua de bebida durante 14 días, demostraron cómo la reducción del sistema PPAR α era debida a una situación de resistencia hepática a la leptina (Roglans y col., 2007; Vilà y col., 2008).

4.2) Regulación alostérica de la β -oxidación

Además de una regulación transcripcional por parte de PPAR α , la vía de la β -oxidación también se regula de manera alostérica de diferentes maneras. La más importante y mejor estudiada de todas ellas, es la inhibición que ejerce la molécula de malonil-CoA sobre el enzima CPT1. En el hígado, el malonil-CoA es un intermediario en la vía de la síntesis *de novo* de ácidos grasos y también actúa como inhibidor de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), el enzima que regula la entrada de moléculas de acil-CoA a la mitocondria, donde serán oxidadas. Sin embargo, en tejidos como el músculo esquelético, donde la síntesis de ácidos grasos *de novo* es mínima, el papel casi exclusivo de la molécula de malonil-CoA es regular la proteína CPT1 (Ruderman y col., 1999). La cantidad de malonil-CoA presente en la célula depende, principalmente, de la acción de la acetil-CoA carboxilasa (ACC), enzima que participa en la vía de la lipogénesis y que cataliza la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA. La proteína ACC es, a su vez, regulada por la cinasa dependiente de AMP (AMPK), que se encarga de mantener la homeostasis energética en respuesta a las fluctuaciones del radio AMP/ATP. En situaciones de demanda energética, este radio incrementa y AMPK se activa, fosforilando e inhibiendo a ACC (Ruderman y col., 1999).

Se han descrito dos principales isoformas de la proteína ACC: una de ellas, conocida como ACCa o ACC1, se encuentra principalmente en tejidos lipogénicos, como el hígado y el tejido adiposo, y presenta un peso molecular de 265 kDa. La segunda isoforma, ligeramente más grande (275-280 kDa), es conocida como ACCb o ACC2 y se expresa sobre todo en tejido muscular y corazón (Ruderman y col., 1999).

El efecto opuesto de la proteína ACC es llevado a cabo por la proteína malonil-CoA deshidrogenasa, regulada también por PPAR α y encargada de eliminar moléculas de malonil-CoA para transformarlas en acetil-CoA. Se ha descrito cómo una alta actividad de β -oxidación está relacionada con una alta actividad de la MCD (Lopaschuk y col., 2010). De esta manera, PPAR α provoca una disminución de las moléculas de malonil-CoA, por lo que ya no tendrá lugar la inhibición alostérica de la proteína CPT1.

4.3) Otros mecanismos reguladores de la β -oxidación

4.3.1) HNF4 y metabolismo lipídico

El receptor nuclear HNF4 (*Hepatocyte nuclear factor 4*) es otro receptor capaz de reconocer a los ácidos grasos como ligandos y regular el metabolismo de lípidos. HNF4 se expresa mayoritariamente en hígado y, a diferencia de los PPARs, no heterodimeriza con el receptor RXR, sino que forma un homodímero (Nakamura y col., 2014). HNF4 es capaz de regular la transcripción de una gran variedad de genes con funciones muy diversas, entre los que se incluyen genes implicados en la metabolización y la secreción de lipoproteínas (apoproteína A1, A5 y B), genes que participan en el metabolismo de carbohidratos (G6Pc y proteína reguladora de la glucocinasa), así como genes de la vía de la lipogénesis (ácido graso sintasa y estearoil-CoA desaturasa) (Nakamura y col., 2014). Además, se ha descrito cómo en hepatocitos humanos HNF4 regula la transcripción de PPAR α de forma positiva (Pineda-Torra y col., 2002).

4.3.2) FGF21: Regulación metabólica en ayunas

Hasta ahora se ha detallado el papel que ejerce PPAR α sobre la β -oxidación de ácidos grasos, un fenómeno que se da especialmente en un estado postprandial, caracterizado por una alta disponibilidad de ácidos grasos por parte de la célula. Sin embargo, PPAR α también tiene una gran importancia en condiciones de ayunas, gracias a la regulación transcripcional del factor de crecimiento llamado FGF21 (*fibroblast growth factor 21*), una hormona que pertenece a la familia de los factores de crecimiento de los fibroblastos.

FGF21 es una hormona endocrina secretada predominantemente por el hígado, pero también por el tejido adiposo, páncreas y músculo. En periodos de ayunas, este factor es capaz de promover la lipólisis, la β -oxidación, o la cetogénesis, lo que indica que FGF21 es un regulador importante en la homeostasis lipídica como mecanismo adaptador a la privación de nutrientes (Kim y col., 2015). El promotor de FGF21 contiene una región PPRE funcional, que se activa tanto en condiciones de ayunas, como por la acción de agonistas de PPAR α . De esta forma, FGF21 incrementa la expresión de enzimas clave en el metabolismo lipídico en hígado, como CPT1 o la HMGCS2 (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2*), proteína mitocondrial que participa en la cetogénesis, una vía metabólica que tiene como función la obtención de

energía a partir de los lípidos. Además, FGF21 induce la lipasa sensible a hormona (HSL) y la lipasa adiposa de triglicéridos (ATGL, *adipose triglyceride lipase*) en adipocitos (Nakamura y col., 2014). FGF21 puede provocar diversas alteraciones metabólicas y ya se ha demostrado en ratones deficientes para este factor cómo una disminución en los niveles de FGF21 provoca en ayunas un descenso en los niveles de glucosa plasmática, así como un descenso de la β -oxidación, cetogénesis y gluconeogénesis. De esta manera, se demuestra que FGF21 es un mediador de los efectos de PPAR α durante un periodo de ayunas (Nakamura y col., 2014).

4.3.3) Conexión Sirt1 – PGC1 α

Como ya se ha mencionado anteriormente, la proteína Sirt1 es capaz de regular una variedad de procesos metabólicos gracias a su actividad desacetilasa. Entre estos procesos, se ha visto como Sirt1 juega un papel importante en el catabolismo de los ácidos grasos a nivel hepático. Se ha descrito que la delección de Sirt1 en el hígado de ratones altera la señalización de PPAR α y disminuye la β -oxidación de ácidos grasos, mientras que la sobreexpresión de la misma induce el efecto contrario (Purushotham y col., 2009). Debido a esta delección de Sirt1, los ratones presentan esteatosis hepática, así como inflamación en hígado como respuesta a una dieta rica en grasa. En este estudio de Purushotham y colaboradores (2009), se sugiere que la regulación de la actividad de PPAR α por parte de Sirt1 se da a través de la desacetilación del coactivador transcripcional PGC1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1*). PGC1 α es un coactivador que se une a otros factores de transcripción, pero con incapacidad de unirse directamente a regiones promotoras. De esta manera, PGC1 α potencia la transcripción de aquellos genes diana para el factor de transcripción al cual se une, como es el caso de PPAR α (Nakamura y col., 2014). Así, un aumento en la actividad Sirt1 comporta una desacetilación y activación de PGC1 α , que potencia el efecto transcripcional de PPAR α , aumentando la expresión de genes que participan en el proceso de la β -oxidación. Estudios previos en nuestro laboratorio (Rebollo y col., 2014b) demostraron en este campo cómo una suplementación con fructosa en ratas hembra durante 14 días producía una disminución de los niveles de Sirt1, así como de NAMPT. Como consecuencia de ello, en el hígado de estas ratas se observó una disminución de la actividad desacetilasa de Sirt1, que provocó un aumento en el grado de acetilación de PGC1 α , lo que implicaba una inactivación de esta proteína y una disminución en la actividad PPAR α y el sistema de β -oxidación.

4.4) β -oxidación en el músculo esquelético: Papel de GPR119

El músculo esquelético también presenta protagonismo en la oxidación de ácidos grasos. Durante un estado postabsortivo, la oxidación de lípidos es la actividad metabólica predominante en el músculo esquelético y a través de la cual este tejido es capaz de obtener hasta el 90% de su demanda energética (Kim y col., 2000). Son muchos los estudios que sugieren que la oxidación lipídica en el tejido muscular se encuentra reducida en situaciones de obesidad, lo que conlleva a un aumento del contenido de lípidos a nivel intramuscular. Además, se ha observado cómo este incremento de lípidos en el músculo esquelético está asociado a un fenómeno de resistencia a la insulina (Kim y col., 2000). Los mecanismos moleculares responsables de este descenso en la oxidación de lípidos por parte del músculo en individuos obesos todavía no han sido dilucidados por completo.

Una posible explicación para este fenómeno sería la reducción en la actividad de la proteína CPT1 β , isoforma predominante en tejido muscular de este enzima responsable de la internalización de las cadenas de ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria, para que posteriormente sean oxidadas (Kim y col., 2000).

Cornall y colaboradores (2013) proponen a la proteína GPR119 (*G-protein-coupled receptor 119*) como responsable de esta disminución en la oxidación de lípidos en el tejido muscular. En este estudio se observó cómo los niveles de mRNA para GPR119 eran superiores en ratas obesas por la dieta. Además, gracias al cultivo de miotubos de ratón C₂C₁₂, se determinó que un incremento en la activación de GPR119 provocaba un descenso en la expresión de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos, como es el caso de PGC1 α , AMPK α y CPT1.

5) ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

En el proceso de síntesis proteica celular, las proteínas que formarán parte de la membrana plasmática o que serán secretadas al exterior de la célula, son plegadas en el lumen del retículo endoplasmático (RE) antes de ser distribuidas a su localización final. La existencia de perturbaciones en la homeostasis del RE pueden conducir a una condición conocida como estrés del RE, que se caracteriza por la activación de diferentes vías de señalización llamadas UPR (*unfolded protein response*), que tienen como objetivo mantener la homeostasis del retículo endoplasmático promoviendo la expansión de la membrana del RE y la síntesis de la maquinaria necesaria para el procesamiento de proteínas, así como activando mecanismos que disminuyen transitoriamente el flujo de proteínas que llegan al RE. Un estado prolongado de la actividad de la respuesta UPR es indicativo de que el estrés de RE no puede ser mitigado y que la homeostasis no puede ser reestablecida, lo que se relaciona con muerte celular (Walter y Ron, 2011).

Se han identificado tres ramas de la respuesta UPR (figura II-13) que actúan de forma paralela. Cada rama se define en función de la proteína transmembrana del RE que actúa como sensor: ATF6 (*activating transcription factor 6*), PERK (*protein kinase-like endoplasmatic reticulum kinase*), e IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*).

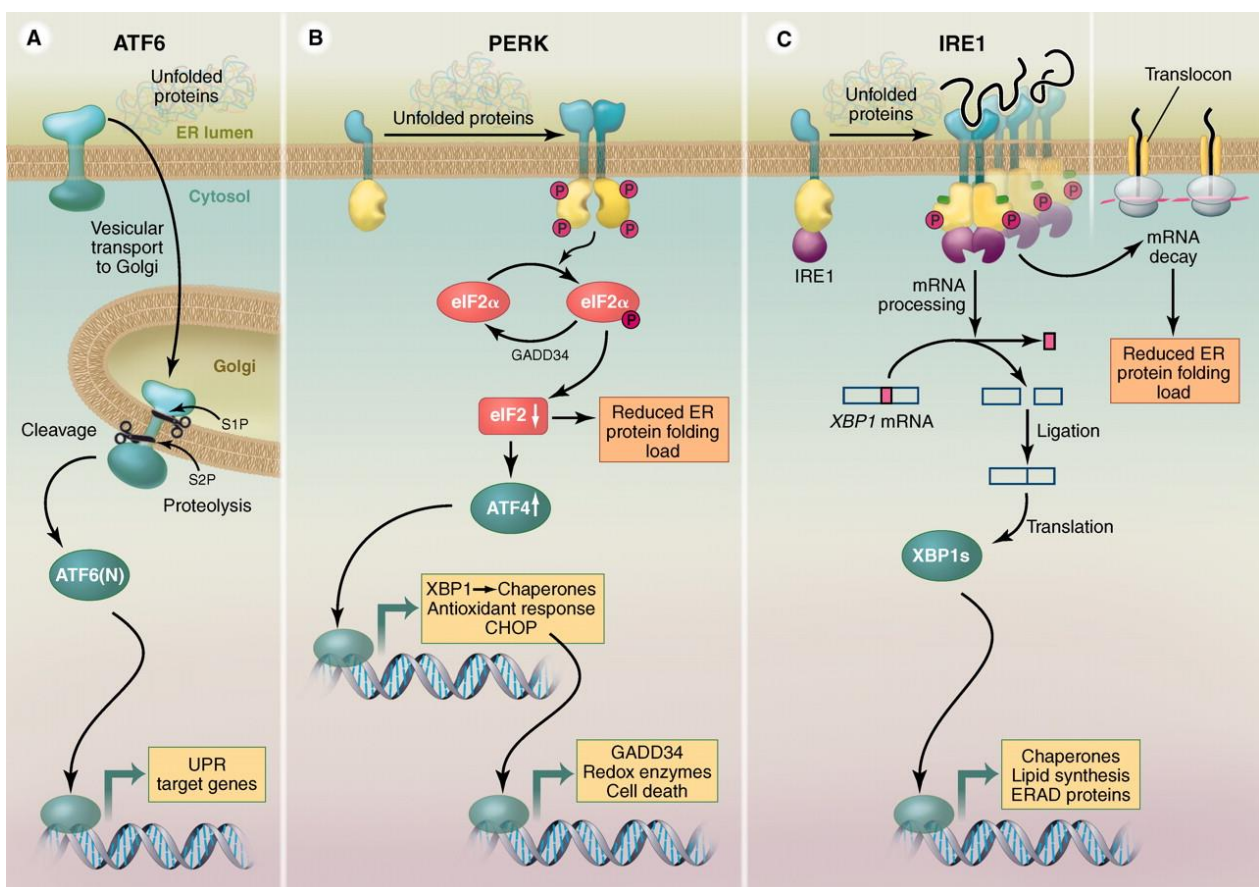


Figura II-13. Las tres ramas de la vía del estrés del RE. Imagen de Walter y Ron (2011).

II. INTRODUCCIÓN TEÓRICA

ATF6 es un factor de transcripción que se sintetiza inicialmente como una proteína transmembrana del RE. Tras algún estímulo capaz de desencadenar la respuesta UPR, la proteína ATF6 se empaqueta en vesículas de transporte y viaja desde el RE hasta el aparato de Golgi (Schindler y Schekman, 2009). En su nueva localización celular, sufre la acción de las proteasas S1P y S2P (*site-1* y *site-2 protease*), liberándose así el fragmento N-terminal de ATF6, ATF6(N), que se transloca al núcleo para ser activo como factor de transcripción y activar así la expresión de genes UPR, como *bip* (un tipo de chaperona de la familia de las *heat shock protein* Hsp70) o *grp94* (*glucose-regulated protein 94*, una chaperona de la familia de las Hsp90).

La segunda rama de la respuesta UPR es mediada por la proteína PERK, una cinasa transmembrana del retículo endoplasmático. Cuando se produce un estrés del RE, esta cinasa oligomeriza y se fosforila a sí misma, lo que provoca la fosforilación del factor iniciador de la traducción eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*), inactivando así a la proteína eIF2, e inhibiendo la traducción de mRNA. De esta forma, PERK ayuda a reducir la entrada de proteínas nuevas en el ER, aliviando de esta manera el estrés de retículo. Sin embargo, algunos mRNAs presentan mayor tasa de traducción cuando el factor eIF2 α está inhibido, como es el caso del mensajero que codifica para el factor ATF4 (*activating transcription factor 4*), que se encarga de la transcripción de algunos genes como *chop* (*transcription factor C/EBP homologous protein*), *gadd34* (*growth arrest and DNA damage-inducible 34*), o *gpr78* (*G-protein coupled receptor 78*) (Walter y Ron, 2011). CHOP es un factor de transcripción que controla genes involucrados en apoptosis, por lo que la rama PERK de la respuesta UPR puede contribuir en vías de muerte celular.

IRE1 define la tercera y mejor estudiada rama de la respuesta UPR. Se trata de una proteína bifuncional transmembrana del RE, ya que es capaz de actuar como cinasa o como endoribonucleasa. Gracias a su capacidad como endoribonucleasa, y en respuesta a una activación de la UPR, IRE1 provoca la fragmentación del mRNA que codifica para el factor de transcripción XBP1 (*X-box binding protein 1*). De esta forma, IRE1 elimina un intrón de 26 pares de bases y los dos fragmentos de mRNA resultantes conducen a la traducción de una proteína de peso molecular más elevado denominada XBP1s (XBP1 "*spliced form*") (Lee y col., 2002). XBP1s es un factor de transcripción clave en la regulación de la respuesta UPR, ya que aumenta la expresión de diversos genes implicados en la maduración, el plegamiento y la degradación de proteínas en el RE. Algunos de estos genes son *dnajb9* (*DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9*), *edem1* (*ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1*), o *sec61 α 1* (*sec61 alpha 1 subunit*). Además, también se ha descrito cómo XBP1s parece tener un papel importante en la regulación de enzimas que participan en la biosíntesis lipídica (Glimcher y Lee, 2009).

Recientemente, esta tercera rama de la UPR ha adquirido gran importancia, ya que se ha investigado su posible relación con la aparición de alteraciones metabólicas. De esta manera, gracias al estudio con modelos animales, se ha identificado el papel del estrés de RE en el desarrollo de resistencia hepática a la insulina (Ozcan y col., 2006; Lee, Scapa y col., 2008). Se ha

demostrado cómo una activación crónica de la señalización por estas vías del estrés del RE activa a la proteína cinasa JNK. La proteína IRE1, esta vez mediante su capacidad cinasa, es capaz de fosforilar y activar a JNK, que gracias a su capacidad serina/treonina cinasa provoca la fosforilación de un residuo inhibitorio en serina de la proteína IRS, lo que implica la inhibición de la señalización por insulina (Chan y col., 2013). Otros estudios demuestran, además, que un aumento en la lipogénesis *de novo* y que la aparición de un fenómeno de resistencia a la insulina en el hígado de ratones alimentados con fructosa, están asociados con la activación de las ramas de IRE1 y de PERK de la vía del estrés del RE (Ren y col., 2012).

5.1) XBP1 y su papel en la lipogénesis hepática

Son varios los estudios que han profundizado en la caracterización de la vía del estrés de retículo endoplasmático y su posible relación con la lipogénesis hepática, ya que tal y como se ha descrito anteriormente, se sabe que XBP1s tiene un papel importante en la regulación de enzimas que participan en la biosíntesis lipídica (Glimcher y Lee, 2009).

Lee, Scapa y colaboradores (2008) demostraron cómo los niveles de algunos genes claves en la lipogénesis hepática, como *scd1*, *dgat2*, o *acc2*, se encontraban disminuidos en ratones deficientes para el factor de transcripción XBP1s. Sin embargo, la expresión de genes regulados por la familia de los SREBPs, como *fas*, *hmgcs*, o *hmgcr* (*HMG-CoA reductase*), no sufrían ningún tipo de modificación. De la misma manera, la expresión del factor ChREBP fue normal en estos ratones. De esta forma, se demostró cómo XBP1s regula la expresión de una serie de genes lipogénicos de una manera independiente de SREBP y ChREBP.

Este grupo de investigación demostró además cómo los niveles de proteína XBP1s en hígado estaban sobreexpresados en ratones alimentados con una dieta al 60% de fructosa, lo que implica un incremento en el *splicing* de este mensajero por la proteína IRE1. Sin embargo, otros marcadores típicos de estrés de RE como BiP o CHOP no se indujeron tras el tratamiento, indicando en este caso la ausencia de estrés de retículo. De esta manera, Lee, Scapa y colaboradores (2008) proponen un papel clave del factor de transcripción XBP1s en la lipogénesis hepática, pero alejado de su función como mediador en la respuesta UPR.

En este sentido, en nuestro grupo de investigación se ha demostrado previamente cómo una ingesta de fructosa al 10% (p/v) en el agua de bebida durante un periodo de 14 días era suficiente como para incrementar los niveles de la forma *splicing* de XBP1, aunque los niveles de otros marcadores de estrés de RE no fueron analizados (Rebollo y col., 2014a).

5.2) Estrés de retículo y su relación con las proteínas SREBP

El retículo endoplasmático juega un papel central en la biosíntesis de lípidos, mediante la producción de fosfolípidos, colesterol, triacilgliceroles y ceramidas. De hecho, el enzima limitante y clave en la síntesis de colesterol, la proteína HMG-CoA reductasa, se encuentra anclada en la membrana del RE. Cuando los niveles de colesterol intracelular descienden, se activan las proteínas SREBPs para aumentar su expresión. La proteína serina palmitoiltransferasa (SPT), enzima limitante en la síntesis de ceramidas *de novo*, también se localiza en la membrana del RE.

De manera similar a lo que ocurre con la proteína ATF6, los factores de transcripción SREBP-1c y SREBP2 se encuentran asociados a la membrana del RE, permaneciendo en estado inactivo. Cuando se da la respuesta UPR, estas proteínas sufren un corte proteolítico y se disocian del complejo aparato de Golgi - retículo endoplasmático, translocando a núcleo. En esta nueva localización celular, SREBP-1c y SREBP2 son capaces de aumentar la expresión genes que controlan la expresión de enzimas implicados en la síntesis de ácidos grasos y de colesterol, respectivamente. Se ha descrito que una esteatosis hepática en ratones *ob/ob* puede ser consecuencia de un estrés de RE, que implica un aumento en el corte proteolítico de SREBP-1c y SREBP2 (Kammoun y col., 2009). Además, se ha observado cómo una sobreexpresión adenoviral del gen *grp78* en este tipo de ratones provoca una disminución en la activación del factor de transcripción SREBP-1c, mejorando además la sensibilidad a la insulina. Por último, se ha demostrado cómo un fenómeno de estrés del RE afecta a la producción de las VLDL, promoviendo la degradación de la apolipoproteína B100 (apoB100) (Ota y col., 2008; Qiu y col., 2009).

5.3) Estrés de retículo e inflamación

La vía del estrés de retículo también juega un papel muy importante en procesos de inflamación, ya que es capaz de provocar un aumento en la expresión del factor TNF α , una citoquina proinflamatoria. Tras la activación de la respuesta UPR, la activación de IRE1 es capaz de provocar una degradación en determinados mRNAs, provocando así una disminución en la traducción de los mismos. Uno de estos mensajeros que son degradados tras una activación de la vía del estrés de retículo, es aquel que codifica para la proteína I κ B (*inhibitor of kappa B*), que se trata de un inhibidor del factor de transcripción NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). En condiciones normales, I κ B se une a NF κ B, manteniendo a este último inactivo en el citosol. Tras una bajada en los niveles de I κ B, el factor NF κ B será liberado y podrá translocar a núcleo, donde será activo, estimulando la transcripción de genes proinflamatorios como TNF α (Cnop y col., 2012).

Esta capacidad de degradar mRNA una vez que la proteína IRE1 está activa, también tiene su importancia en enfermedades metabólicas. Por ejemplo, se ha demostrado cómo una sobreexpresión de IRE1 es capaz de provocar una disminución en los niveles de mRNA que codifican para la insulina en células β del páncreas (Lipson y col., 2008).

5.4) Estrés de retículo y gluconeogénesis

Por último, cabe destacar la relación existente entre la vía del estrés de retículo y la gluconeogénesis hepática. XBP1s es capaz de regular este proceso, gracias a su interacción con el factor de transcripción FoxO1. XBP1s tiene capacidad de unión a FoxO1, marcando a éste para su degradación proteosomal y provocando así una inhibición en la expresión de genes gluconeogénicos como *pepck* y *g6pc*. De esta manera, se disminuye la síntesis de glucosa hepática y su salida a la circulación plasmática (Cnop y col., 2012).

6) AUTOFAGIA Y SU PAPEL EN LAS ALTERACIONES METABÓLICAS

El fenómeno de autofagia es un proceso catabólico por el cual algunos componentes celulares, entre los que se encuentran orgánulos dañados, proteínas defectuosas o mal plegadas y patógenos intracelulares, son degradados gracias a la acción de los lisosomas (Yorimitsu y col., 2005). En condiciones basales, la autofagia se encarga de la degradación de proteínas “viejas” (*long-lived proteins*); mientras que la vía proteosoma-ubiquitina, otro importante proceso catabólico celular, se encarga de la degradación de proteínas “jóvenes” (*short-lived proteins*) (Nedelsky y col., 2008). La autofagia es una vía crucial para el desarrollo, diferenciación, supervivencia y homeostasis celular. Cuando la célula se enfrenta a un estrés, como puede ser una privación de nutrientes, se activa la maquinaria de la autofagia con el objetivo de obtener energía mediante la degradación de componentes ya presentes en el citosol y, de esta manera, mantener la homeostasis energética celular. Se trata pues de un proceso muy importante y se ha demostrado cómo la autofagia, o una alteración de la actividad normal de la misma, es responsable de la aparición de muchas patologías, incluyendo alteraciones metabólicas (Choi y col., 2013).

Se han identificado tres tipos de autofagia (macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas), que se diferencian según su función fisiológica y según la manera en la que se libera el material a degradar en el interior del lisosoma (Lavallard y col., 2012). El presente trabajo se centra en el estudio de la macroautofagia (referida a partir de ahora simplemente como autofagia), el mayor mecanismo de regulación catabólica que utilizan las células eucarióticas para degradar proteínas “viejas” y orgánulos (Mizushima y col., 2008).

Recientemente, se ha descrito una vía alternativa de metabolismo lipídico a través de la degradación autofágica de lípidos mediante la participación de lisosomas (Liu y Czaja, 2013). En esta nueva vía conocida como lipofagia, los triglicéridos y el colesterol presentes en las conocidas como gotitas lipídicas (*lipid droplets*, LD) -lugares de almacenaje intracelular de estas moléculas-, son captados por autofagosomas y liberados al interior de los lisosomas, donde serán degradados mediante la acción de las hidrolasas. Los ácidos grasos generados por la lipofagia a partir de estos triglicéridos almacenados, estimulan la β -oxidación mitocondrial (Singh y col., 2009). De esta manera, la lipofagia regula los niveles de lípidos intracelulares y se activa en función de estímulos extracelulares, como el aporte energético que le llega a la célula. Se ha descrito cómo alteraciones en el funcionamiento normal de la autofagia pueden conducir a una acumulación excesiva de lípidos, provocando esteatosis hepática (Amir y Czaja, 2011), una de las características de la NAFLD.

6.1) Papel de mTOR

Un mecanismo que podría explicar un déficit en la actividad autofágica en los pacientes con NAFLD es aquel que se basa en una activación de la proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Esta proteína es una serina/treonina-cinasa que, en asociación con otras proteínas, forma parte de dos complejos diferentes: mTORC1 y mTORC2, cada uno con diferentes funciones. El complejo mTORC1 se activa en respuesta a nutrientes como aminoácidos, diferentes factores de crecimiento y hormonas como la insulina, participando en el crecimiento y la proliferación celular, la progresión del ciclo celular y en la síntesis de proteínas y ácidos grasos. El complejo mTORC2, por su parte, se activa también gracias a la insulina y a otros factores de crecimiento y tiene como función, además de su participación en la vía de señalización de la insulina, el control de la organización del citoesqueleto de actina y el control de la medida celular y de la progresión del ciclo celular (Foster y Fingar, 2010). Con respecto a la autofagia, se ha demostrado cómo el complejo mTORC1 es el que presenta una gran importancia en la regulación de este proceso en eucariotas (Naito y col., 2013; Lavallard y col., 2012). De hecho, hay estudios que determinan cómo unos altos niveles de glucosa son capaces de inhibir la autofagia a través de la activación de mTORC1 (Kim, Kundu y col., 2011).

El proceso de autofagia se realiza gracias a la participación de una serie de genes, descubiertos inicialmente en levaduras y altamente conservados, que codifican para unas proteínas llamadas ATG (*autophagy-related genes*), necesarias para la formación del autofagosoma (Nakatogawa y col., 2009). El proceso de formación de este autofagosoma se puede dividir en tres pasos: (i) iniciación, con la participación de la proteína Ulk1 (*uncoordinated 51-like kinase 1*); (ii) nucleación, gracias al complejo Beclina1-PI3K; y (iii) elongación, donde interviene la proteína LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*) (Rautou y col., 2010). Una vez formado el autofagosoma, éste se fusiona con los lisosomas cargados con hidrolasas para la formación del autofagolisosoma y la degradación del material contenido inicialmente en el autofagosoma (figura II-14).

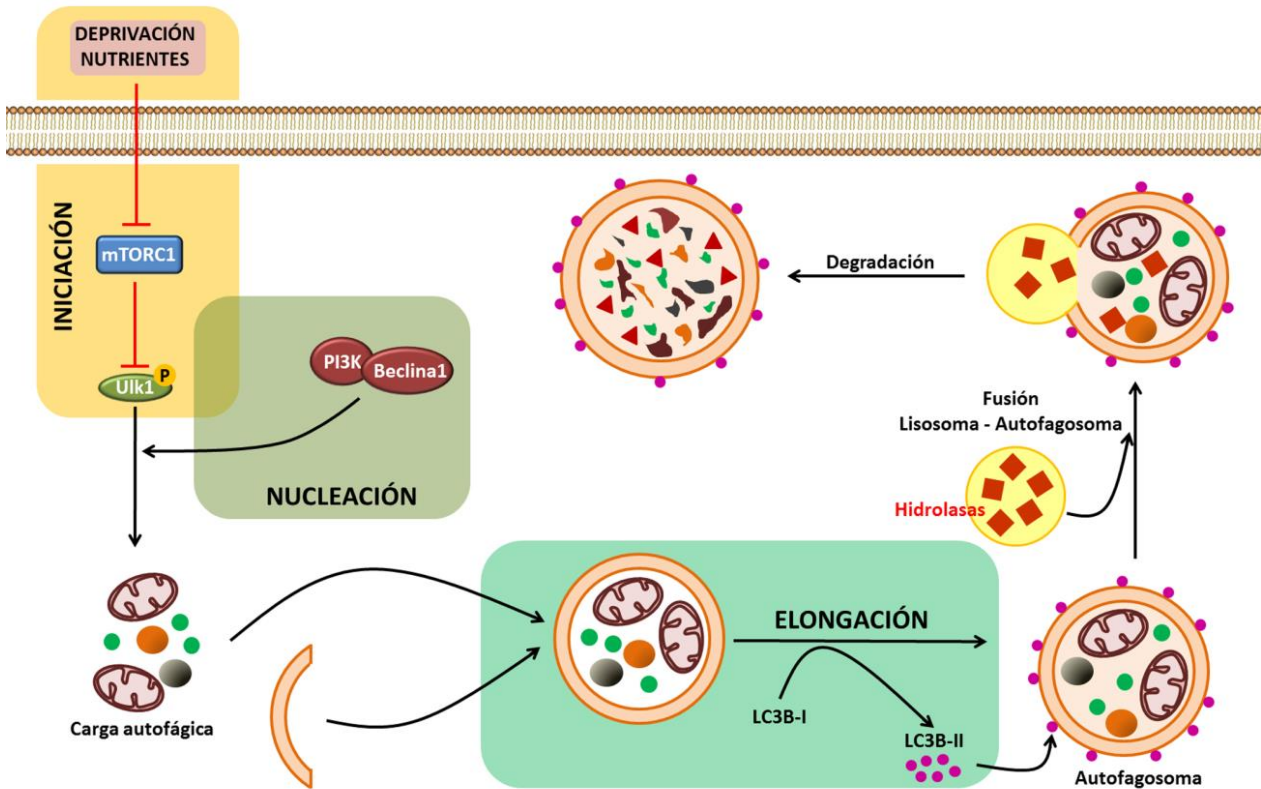


Figura II-14: Proceso de autofagia y algunas proteínas reguladoras en la formación del autofagosoma.

La proteína mTOR se activa como respuesta a un aumento de la insulina en plasma, inhibiendo la autofagia. La insulina se une a su receptor y activa la cascada de fosforilaciones típica de esta vía, anteriormente explicada y que finaliza con la activación de la proteína Akt. La proteína Akt fosforila a la proteína TSC2, e impide de esta forma la formación del complejo TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis complex 1/2*). Cuando es activo, este complejo inhibe a Rheb (*ras homolog enriched in brain*), una proteína GTPasa que en su forma GTP se une y activa a mTOR. Por tanto, una inhibición del complejo TSC1/2 por parte de Akt implica una activación de mTOR y una inhibición de la autofagia (Zhang y col., 2003). La proteína mTOR activa, interacciona e inhibe por fosforilación en un residuo específico (serina⁷⁵⁷) a la proteína cinasa Ulk1, impidiendo así el paso de la iniciación en la formación del autofagosoma. Se ha descrito también que, además de Akt, la cinasa p38 es capaz de fosforilar a la proteína TSC2, provocando así la actividad inhibitoria de mTOR en la autofagia (Li y col., 2003).

Se ha observado cómo un alto índice glucolítico provoca un aumento en la disponibilidad de la proteína Rheb para unirse al complejo mTORC1 y activarlo como consecuencia de la supresión de la interacción entre las proteínas GAPDH y Rheb (Lee y col., 2009). De esta manera, se establece una conexión entre las vías de la glucólisis y de la autofagia, en la que un aumento en la ingesta de carbohidratos produce un descenso en la actividad autofágica.

Además de la proteína Rheb, otro tipo de GTPasas son capaces de regular la actividad de mTOR y, por lo tanto, de la autofagia. Se trata de la familia de las proteínas Rag, formada por los miembros RagA-D, que actúan como sensores de diferentes estímulos intracelulares, como por ejemplo la concentración de aminoácidos y, en menor medida, de glucosa. De esta manera, una alta carga de aminoácidos en la célula que pueda provenir de la dieta, provoca que estas proteínas pasen de su forma inactiva GDP a su forma activa GTP, uniéndose así y activando a mTOR (Efeyan y col., 2013).

Por otro lado, el ensamblaje de proteínas reguladoras al complejo mTORC1, como son la proteína Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) y mLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein 8*) y, por lo tanto la activación del mismo, es controlado por un complejo multiproteico conocido como complejo Tel2-Tti1-Tti2 (TTT)-RUVBL1/2. Se ha descrito una correlación positiva entre los mRNAs de este complejo y la expresión de genes involucrados en la glucólisis, en la vía de las pentosas fosfato y en la biosíntesis de lípidos (Kim y col., 2013). De esta manera, se ha observado cómo un aumento en la glucólisis provoca el ensamblaje del complejo TTT-RUVBL1/2, necesario a su vez, para el ensamblaje del complejo mTORC1 y la activación del mismo (figura II-15).

Tal y como se ha mencionado, el complejo mTORC1 juega un papel importante como regulador de muchas vías, activando o desactivando a muchas proteínas diana gracias a mecanismos de fosforilación en residuos específicos. Es el caso, por ejemplo, de la proteína 4E-BP1 (*eIF4E binding protein*), que se trata de un represor de la traducción de mRNA. Se ha descrito cómo mTORC1 es capaz de fosforilar e inactivar a 4E-BP1, liberando así a la proteína eIF4E (*Eukaryotic translation initiation factor 4E*) y favoreciendo el inicio de la traducción de nuevas proteínas (Gingras y col., 1998). Además, se ha observado cómo este aumento en la transcripción y posterior traducción de proteínas dependiente de mTORC1 es gracias a la activación de la vía Akt-PI3K, demostrándose así la importancia de la conexión entre la vía de señalización por insulina y la actividad de mTORC1. Una función similar, dependiente también de mTOR, tiene el eje formado por las proteínas S6K/rpS6. La cinasa S6 (S6K) es una diana directa del complejo mTORC1, y una vez activa es capaz de fosforilar y activar a su vez a la proteína ribosomal S6 (rpS6), que participa en una gran cantidad de procesos metabólicos, tales como la transcripción y traducción de nuevas proteínas, así como en el crecimiento y el metabolismo celular (Magnuson y col., 2012) (figura II-15).

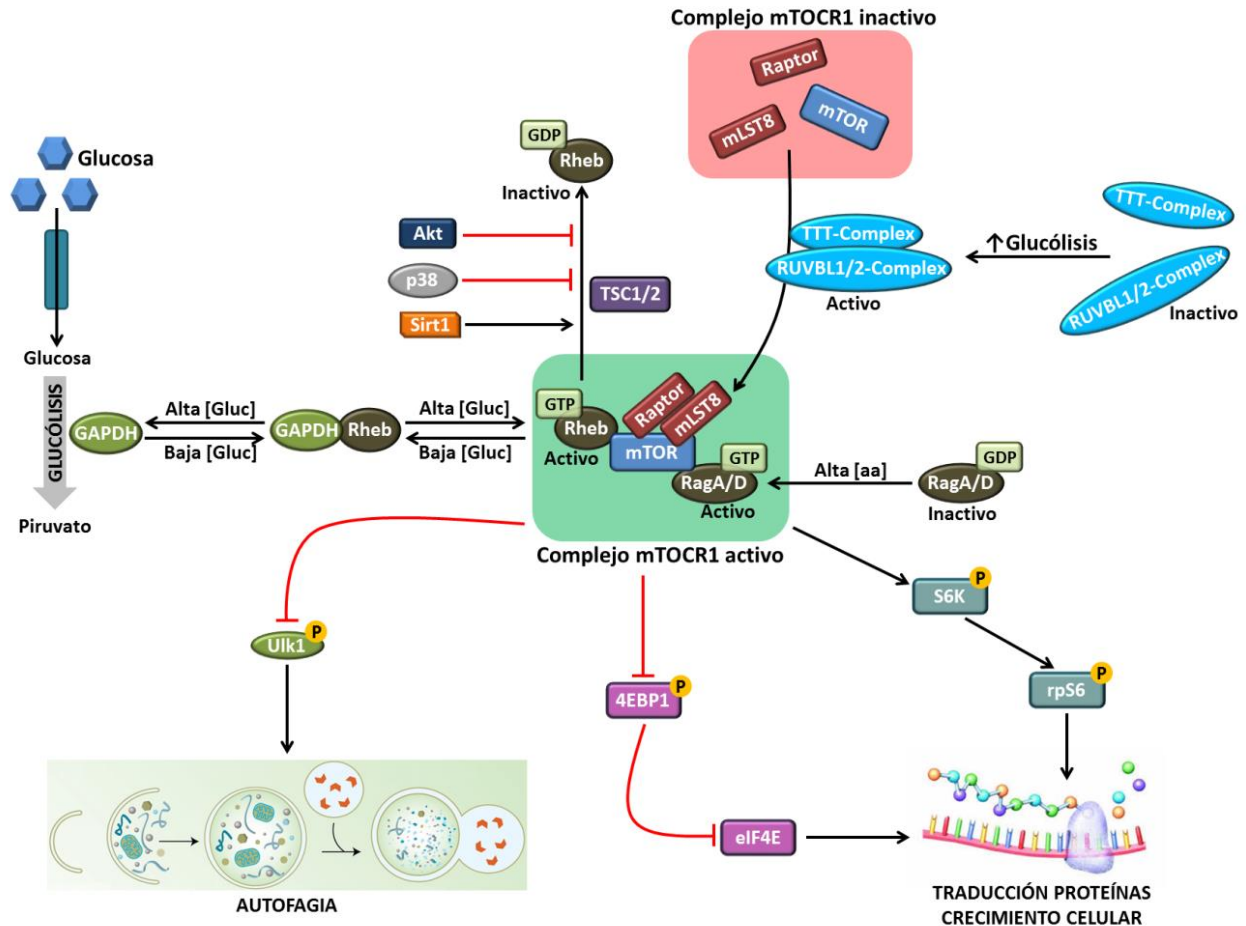


Figura II-15. Mecanismo de formación y activación del complejo mTORC1.

Otra proteína importante en la regulación de la autofagia a través de mTORC1 es la proteína adaptadora p62, también conocida como sequestrina 1, que interactúa selectivamente con diferentes proteínas señalizadoras para regular diversas funciones celulares, como supervivencia, inflamación, apoptosis y autofagia. La localización celular de p62 contribuye a la especificidad y plasticidad a la hora de modular todas estas funciones. Duran y colaboradores (2011) demuestran cómo p62 interactúa con raptor, una de las proteínas que forman parte del complejo mTORC1, actuando como regulador positivo de dicho complejo. La proteína p62 actúa como marcador de autofagia, ya que su eliminación del citoplasma es debida principalmente a este proceso, por lo que su cantidad intracelular está inversamente relacionada con la actividad autofágica. De esta forma, una mayor cantidad de p62 indicaría una disminución de la autofagia (Lippai y Low, 2014). Precisamente, Duran y colaboradores también hipotetizan que una depleción de p62, al igual que de mTOR, inhibiría la autofagia en respuesta a una situación de privación de nutrientes.

6.2) Autofagia y Sirt1

Por último, cabe destacar los estudios recientes que relacionan la actividad de las sirtuinas modulando la autofagia. Tal y como se ha mencionado anteriormente, las sirtuinas son una familia de desacetilasas que regulan diferentes procesos, gracias a su capacidad de eliminar grupos acetil de sus proteínas diana. Entre estos procesos destacan la senescencia celular, inflamación, proliferación y apoptosis celular; pero también participan en la regulación de la homeostasis de lípidos y carbohidratos en función de la disponibilidad energética de la célula (Gerhart-Hines y col., 2007).

Sin embargo, recientemente se ha postulado cómo estas sirtuinas, y en concreto Sirt1, participan en la regulación de la autofagia. Lee, Cao y colaboradores (2008) demostraron cómo Sirt1 es capaz de activar la autofagia mediante la desacetilación de proteínas importantes en este proceso. Ghosh y colaboradores (2010) van más allá y defienden que las vías de mTOR y Sirt1 están conectadas, convergiendo ambas en el punto TSC2. De esta manera, Sirt1 establecería una regulación negativa en mTOR a través de su asociación con TSC2. Sirt1 activaría a TSC2, inhibiendo así la actividad de mTOR y, por lo tanto, inhibiendo también la autofagia. Estos investigadores demostraron cómo una deficiencia en Sirt1 provocaba un aumento en la señalización de mTOR, que podría conducir a un descenso en la autofagia.

Son varios los estudios que también muestran un papel clave de Sirt1 como modulador de la autofagia a través de la desacetilación de la proteína LC3. Huang y colaboradores (2015) demuestran cómo en situación de privación de nutrientes la proteína LC3 se desacetila gracias a la actividad de Sirt1 y, como consecuencia de ello, se vuelve activa. Este mismo grupo de investigación demuestra cómo el estado de acetilación de LC3 condiciona su localización celular, siendo la proteína Sirt1 la encargada de controlar este estado de acetilación.

7) FRUCTOSA Y ATEROESCLEROSIS

Tal y como se ha comentado anteriormente, la fructosa supone un gran riesgo a nivel metabólico para tejidos tan importantes como el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo. Además de ejercer alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos en estos tejidos, la fructosa es un factor de riesgo a nivel cardiovascular, produciendo efectos patológicos a nivel cardíaco.

En este aspecto, el consumo de fructosa adquiere gran importancia debido a su estrecha relación con el consumo de grasas, en lo que se conoce como “dieta western”. Se ha observado cómo un consumo crónico de dietas ricas en grasa favorece la aparición de enfermedades coronarias, así como diabetes tipo 2 (Rutledge y Adeli, 2007). Además, se sabe que mientras la dieta rica en grasa favorece el incremento de lípidos periféricos, la ingesta de importantes cantidades de fructosa genera un aumento en la síntesis de lípidos hepáticos (Ren y col., 2012). Dado que la conocida como “dieta western” se caracteriza por el consumo elevado de ambos componentes dietéticos, es posible que los efectos adversos de la ingesta de grasas se sumen a los de la fructosa. Es por este motivo que se considera de gran interés evaluar los posibles efectos que una ingesta combinada de grasas y fructosa pueden tener en diferentes alteraciones, como por ejemplo las lesiones ateroscleróticas, la obesidad, la dislipemia y otras.

La aterosclerosis y sus principales consecuencias, entre las que destacan las enfermedades coronarias, la cardiopatía isquémica, la enfermedad cerebrovascular, la enfermedad vascular arterial periférica obstructiva y los aneurismas ateroscleróticos, están consideradas desde el punto de vista epidemiológico, como la primera causa de muerte en todos aquellos países donde las infecciones no ocupan este lugar preponderante. Por ejemplo, en la actualidad se producen anualmente en España más de 125.000 muertes y más de 5 millones de estancias hospitalarias por enfermedades cardiovasculares, siendo éstas la primera causa de muerte y hospitalización en la población española (Gutiérrez y col., 2011).

La aterosclerosis se puede considerar como la respuesta del tejido conectivo de la pared arterial frente a una agresión permanente. El estado biológico natural de esta pared se ve alterado debido al efecto de los agentes agresores y, como consecuencia, en la zona afectada se produce la correspondiente respuesta tisular defensiva, caracterizada por los fenómenos de las respuestas inflamatorias y de la inmunidad. La aterosclerosis debe ser considerada como una enfermedad del metabolismo general, cuyo órgano diana es la pared arterial (Mudau y col., 2012).

Las lipoproteínas plasmáticas, especialmente las de baja densidad (LDL), son la principal fuente de colesterol que se acumula en la pared arterial. Estas partículas retenidas son susceptibles de sufrir modificaciones químicas y estructurales, dando lugar a las conocidas LDL oxidadas (ox-LDL) (Kim y col., 2011).

Los macrófagos también juegan un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis, ya que se ha visto cómo su infiltración en la pared de la arteria es la responsable de la inducción de las lesiones iniciales. Los macrófagos se infiltran en el endotelio y se transforman en células espumosas mediante la acumulación de lipoproteínas. Una vez allí, estas células median la respuesta inflamatoria debido a la secreción de diferentes moléculas proinflamatorias, como citocinas o quimiocinas, promoviendo así el reclutamiento de otros tipos celulares en la zona, como monocitos, células T o fibroblastos, que promueven la aterogénesis (Robbins y col., 2013).

Debido a que la rata es resistente al desarrollo de procesos ateroscleróticos, es necesaria la utilización de otro modelo experimental para el estudio del desarrollo de procesos ateroscleróticos. Por este motivo, se ha aceptado al ratón deficiente para el receptor de las LDL ($rLDL^{-/-}$) como un buen modelo para estudiar la aterosclerosis inducida por la dieta (Tangirala y col., 1995). Otra ventaja que presenta el modelo murino en este campo frente a la rata como animal de experimentación es la gran variedad de animales *Knock-Out* que podemos encontrar en la actualidad, y que son verdaderamente útiles a la hora de profundizar en el estudio de diferentes patologías, como es el caso de las patologías cardiovasculares.

Gracias al uso de ratones *Knock-Out* para el receptor de lipoproteínas de baja densidad, se ha observado cómo una dieta suplementada con un 1.25% de colesterol durante 6 meses produce hipercolesterolemia, aparición de estrías grasas que se transforman en placas fibrosas y aumento de macrófagos, compatible con un cuadro de aterogénesis temprana (Kowala y col., 2000). Además, se ha descrito en ratones de ambos sexos deficientes para el receptor de las LDL, cómo una dieta rica en fructosa presenta un incremento similar del peso corporal con respecto a una dieta rica en grasas, así como unos niveles muy parecidos de adipogénesis, hiperglucemia, hipercolesterolemia y aterosclerosis (Police y col., 2009).

Otros estudios con ratones macho $rLDL^{-/-}$, en los que se comparó una ingesta de fructosa sólida al 60% con una dieta rica en grasa durante un periodo de 5 meses y medio, confirmaron la teoría de que se trataba de un buen modelo de resistencia a la insulina y de aterosclerosis. Además, los animales con dieta rica en grasa presentaron resistencia a la insulina en mayor grado, así como un incremento superior de colesterol y glucosa, mientras que los animales que consumieron fructosa presentaron lesiones ateroscleróticas significativamente superiores (Merat y col., 1999).

En la actualidad, también está aceptado el modelo murino deficiente para la apolipoproteína-E ($ApoE^{-/-}$) como buen modelo para estudiar fenómenos de lesión aterosclerótica. Sin embargo, este modelo presenta algunas diferencias con respecto al ratón $rLDL^{-/-}$. Mientras que ambas cepas presentan esteatosis hepática, las manifestaciones son más severas en ratones $rLDL^{-/-}$, debido a que la respuesta desencadenada se ve promovida por la dieta ingerida. Sin embargo, los ratones $ApoE^{-/-}$ desencadenan lesiones de una manera constitutiva y a más temprana edad, independientemente de la dieta administrada (Joven y col., 2007).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación, basados en la ingesta de fructosa líquida al 10% (p/v) en el agua de bebida durante una suplementación semiaguda de 14 días en ratas hembra, mostraron cómo este azúcar era capaz de inducir alteraciones en el metabolismo energético y en la vía de señalización de la insulina.

Es por ello que para el presente trabajo se planteó la **hipótesis** de que un mantenimiento sostenido a lo largo de una suplementación subcrónica de las alteraciones metabólicas ya caracterizadas podría ser el responsable del empeoramiento progresivo de la homeostasis metabólica y de la aparición de fenómenos no observados hasta la fecha en nuestro grupo de investigación, como es el caso de la autofagia, del estrés de retículo endoplasmático y de la inflamación. Dichos cambios facilitarían la progresión de las alteraciones metabólicas a un cuadro de síndrome metabólico. Además, teniendo en cuenta los estudios previos realizados en tejido hepático, también se planteó la hipótesis de que la alteración del metabolismo de la glucosa observada hasta la fecha en ratas hembra Sprague-Dawley pudiese afectar a otros tejidos insulino-dependientes, como el músculo esquelético y el tejido adiposo.

Como consecuencia, los **objetivos** que se llevaron a cabo en la presente tesis doctoral fueron:

1. Estudiar el efecto que la fructosa produce sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos en una suplementación subcrónica (56 días) al 10% (p/v) en el agua de bebida en ratas hembra Sprague-Dawley.
2. Estudiar el efecto de una suplementación subcrónica con fructosa al 10% (p/v) en el agua de bebida en ratas hembra Sprague-Dawley sobre las vías metabólicas de estrés de retículo, autofagia, inflamación y estrés oxidativo, así como los mecanismos moleculares implicados.
3. Comparar el efecto de una ingesta de fructosa frente a una ingesta isocalórica de glucosa, en relación a una posible aparición de resistencia a la insulina en los tres tejidos sensibles a esta hormona: hígado, tejido muscular esquelético y tejido adiposo.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1) ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

1.1) Diseño del estudio

- **Estudio 1:** Se utilizaron 18 ratas hembra Sprague-Dawley de 8 semanas de edad (Charles River, Barcelona). Los animales se mantuvieron estabulados durante un período de 3 semanas, en condiciones de temperatura y humedad constantes, siguiendo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, y con acceso libre a la comida y al agua. Pasado este período, los animales fueron aleatorizados y separados en 2 grupos de estudio: un grupo control, formado por 8 ratas alimentadas con una dieta estándar (Harlan® 2014) *ad libitum*; y un grupo fructosa, formado por 10 ratas alimentadas con la misma dieta, pero suplementada con un 10% (p/v) de fructosa (Applichem) en el agua de bebida. Esta dieta se mantuvo durante un periodo de 56 días.
- **Estudio 2:** Se utilizaron 30 ratas hembra Sprague-Dawley de 8 semanas de edad (Charles River, Barcelona). Los animales se mantuvieron estabulados durante un período de 3 semanas, en condiciones de temperatura y humedad constantes, siguiendo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, y con acceso libre a la comida y al agua. Pasado este período, los animales fueron aleatorizados y separados en 3 grupos de estudio: un grupo control, formado por 10 ratas alimentadas con una dieta estándar *ad libitum*; un grupo fructosa, formado por 10 ratas alimentadas con la misma dieta, pero suplementada con un 10% (p/v) de fructosa en el agua de bebida; y un grupo glucosa, formado por 10 ratas alimentadas con dieta estándar, pero suplementada con un 8-10% (p/v) de glucosa (Applichem) en el agua de bebida. Esta dieta se mantuvo durante un período de 56 días. Con el fin de analizar el efecto de la fructosa y de la glucosa sobre la vía de señalización de la insulina, a 6 animales de cada grupo (control, fructosa y glucosa) se les administró 15 minutos antes del sacrificio, una dosis intraperitoneal de insulina (Humulina Regular, Lilly), a una dosis de 0.5 UI/g, mientras que a los 4 animales restantes de cada grupo se les administró suero fisiológico.

En ambos estudios se midió diariamente la ingesta de bebida y de comida de cada jaula, a razón de 2 ratas por jaula. Asimismo, se controló el peso de los animales semanalmente. Durante los 56 días del estudio, los animales se mantuvieron estabulados en cámaras de presión positiva, para favorecer la sincronización del ciclo estral de los mismos.

Tras un ayuno de 2 horas (para el estudio 1) o de 12 horas (para el estudio 2), los animales fueron sacrificados mediante una anestesia formada por una mezcla de ketamina/xilacina, a una dosis final de 9 mg de ketamina y 1 mg de xilacina por 100 g de peso corporal (Ketamina: Imalgene, Merial; Xilacina: Rompun®, Bayern).

Tras el sacrificio de los animales, se procedió a la obtención de sangre mediante la punción en la vena porta y a la extracción de los tejidos de interés: hígado, tejido adiposo (subcutáneo) y músculo esquelético (cuádriceps y soleus).

El hígado se pesó y, a partir de él, se cortaron diferentes porciones para la realización de los distintos análisis. Una pequeña porción se destinó al aislamiento de RNA y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Otra parte se aisló para el estudio de necrosis, fibrosis y esteatosis hepática. El resto del hígado se perfundió con NaCl 0.9% (p/v), para la obtención posterior de diferentes porciones, destinadas a la obtención de extractos totales y nucleares de proteína, lípidos y sobrenadante postnuclear. Se procuró siempre tomar los mismos lóbulos de hígado para cada tipo de extracto a obtener, con el fin de evitar una posible variabilidad en los resultados finales. El tejido adiposo visceral, al igual que el hígado, se pesó y se aisló, congelándolo inmediatamente en nitrógeno líquido. Una parte del mismo se utilizó para el análisis del RNA y otra parte para el estudio de proteínas. El tejido muscular se obtuvo a partir del aislamiento del músculo cuádriceps (destinado a la obtención de extractos proteicos) y del músculo soleus (destinado a la obtención y aislamiento de RNA).

Seguidamente, las muestras de los tres tejidos destinadas a la obtención de extractos de proteína y de RNA fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior utilización. La muestra de hígado correspondiente a la obtención de sobrenadante postnuclear se procesó inmediatamente, ya que esta extracción se realizó a partir de tejido fresco (apartado 4).

Todos los procedimientos se realizaron según las pautas descritas por el Comité de Bioética de la Universitat de Barcelona, tal y como se ha establecido en la Ley 5/1995 (21 de julio) de la Generalitat de Catalunya.

1.2) Test de tolerancia a la glucosa y curva de insulina

Estas determinaciones se realizaron con los 30 animales del estudio 2. Una semana antes del sacrificio de los mismos, éstos se dejaron en ayunas durante 6 horas. Transcurrido ese tiempo, se les inyectó glucosa por vía intraperitoneal a razón de 2 gramos por Kg de peso corporal, a partir de una solución de 0.4 g glucosa/ml preparada en NaCl 0.9% (p/v).

Se determinó la concentración de glucosa en sangre a los 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración de glucosa. La sangre se obtuvo a partir de un pequeño corte en el ápice de la cola del animal y la concentración de glucosa se determinó gracias al uso de tiras reactivas (Accutrend Glucose; ref.11447475, Roche Farma) y al glucómetro *Accutrend® Plus System* (Roche Farma).

Para la determinación de la curva de insulina, a los 0, 15 y 120 minutos posteriores a la administración de glucosa se obtuvo una muestra de sangre adicional mediante tubos colectores (*Micro tube 1.1 ml Z-Gel*, Sarstedt). El plasma se aisló por centrifugación y el análisis de la concentración de insulina plasmática se determinó mediante un ensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2) DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PLASMÁTICOS

2.1) Análisis de las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol

La determinación de las concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol en los animales de los dos estudios se realizó gracias al glucómetro *Accutrend® Plus System* (Roche Farma) y a las siguientes tiras reactivas:

- Glucosa: Accutrend Glucose; ref.11447475, Roche Farma; con un margen de detección de 20-600 mg/dl.
- Triglicéridos: Accutrend Triglycerides; ref.11538144, Roche Farma; con un margen de detección de 70-600 mg/dl.
- Colesterol: Accutrend Cholesterol; ref.11418262, Roche Farma; con un margen de detección de 150-300 mg/dl.

2.2) Obtención de plasma

En el momento del sacrificio de los animales, la sangre obtenida a partir de la punción en la vena porta se recogió en tubos colectores (*Micro tube 1.1 ml Z-Gel*, Sarstedt). Seguidamente, éstos se centrifugaron a 10000 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente, para la obtención del plasma (sobrenadante), que se guardó a -80°C hasta su posterior utilización.

2.3) Análisis de ácido úrico

La determinación de las concentraciones de ácido úrico en plasma de los animales del estudio 1 se realizó gracias al Kit *Uricase-POD. Enz-Color* (Spinreact), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4) Análisis de endotoxinas

Se realizó un estudio de los niveles de endotoxinas en plasma de las ratas tras 56 días de estudio mediante una técnica colorimétrica. La técnica consistió en la incubación de las muestras de plasma en una solución con un proenzima que, gracias a la presencia de endotoxinas, se transforma en un enzima activo. Este enzima activo posteriormente se incubó con una solución que contenía el sustrato para este enzima, formándose así un producto que adquirió color amarillo, fácilmente medible espectrofotométricamente a 405-410 nm. Los niveles de endotoxinas en cada muestra se determinaron mediante la extrapolación en una recta estándar, con concentraciones conocidas de endotoxinas.

La determinación de las concentraciones de endotoxinas en plasma de los animales del primer estudio se realizó gracias al Kit *R160* (Charles River Endofase), siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de la absorbancia a 405-410 nm se realizó con un espectrofotómetro de microplaca (Bio-Rad Benchmark Plus). Con el fin de evitar interferencias en los resultados, todo el proceso se realizó con material libre de endotoxinas (Endosafe® tips, Charles River).

2.5) Análisis de ácidos grasos no esterificados

La determinación de las concentraciones de ácidos grasos no esterificados (NEFAs) en plasma de los animales del estudio 2 se realizó gracias al Kit *5620-01* de Bioo Scientific, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.6) Fraccionamiento de las lipoproteínas plasmáticas: FPLC

Con el objetivo de analizar el perfil de las lipoproteínas en plasma, se realizó una cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC, *Fast Protein Liquid Chromatography*) a partir de un *pool* de plasma de todas las muestras para cada grupo de estudio. Este análisis se realizó en el *Servei de Bioquímica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* de Barcelona, siguiendo el protocolo establecido por Escolà-Gil y colaboradores (2000). Las fracciones obtenidas en la FPLC fueron analizadas para determinar la concentración de colesterol total y triglicéridos presentes en plasma.

2.7) Análisis de las concentraciones de insulina, adiponectina, leptina y FGF21

Para la determinación de las concentraciones de insulina, adiponectina y leptina plasmática de los animales del estudio 1 se realizó la técnica del radioinmunoensayo (RIA). Esta técnica se basa en la formación específica de complejos antígeno-anticuerpo, que se utiliza para medir la concentración de un determinado antígeno. Una cantidad fija de antígeno (insulina, por ejemplo) marcado con radioactividad (I^{125}) se incubaba en presencia de una cantidad constante de antisuero específico. Así, si se añade una muestra de plasma con una cantidad desconocida de insulina en este sistema, se produce una competición entre la insulina marcada y la no marcada por los lugares de unión al anticuerpo, de manera que a medida que la concentración de insulina en la muestra de plasma (no marcada) aumenta, la cantidad de insulina marcada que se une al anticuerpo disminuye. Después de separar la insulina marcada unida al anticuerpo de la que se encuentra libre, se puede medir la cantidad de radioactividad procedente de la insulina- I^{125} unida al anticuerpo mediante la lectura en un contador gamma. Paralelamente, se realiza una curva estándar con concentraciones conocidas y crecientes de insulina no marcada, que permite conocer la cantidad de insulina presente en las muestras de plasma.

La concentración plasmática de insulina se determinó con el kit de RIA *RPA547* de Amersham Biosciences Europe GmbH, mientras que los niveles de adiponectina y leptina se determinaron mediante los kits de RIA *MADP-60HK* y *RL83K* de Linco Research (St. Charles, MO), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Con respecto a los animales del estudio 2, las concentraciones de insulina, adiponectina y FGF21 en plasma, se determinaron mediante ensayos ELISA. Esta técnica consiste en la detección de un antígeno (en este caso, nuestra hormona de interés) mediante la unión específica a un anticuerpo conjugado con un enzima capaz de generar un producto detectable, como por ejemplo color, que será medido a una determinada longitud de onda. A mayor antígeno en la muestra, mayor color emitido. Mediante el uso de una recta patrón con concentraciones de antígeno conocido, se puede extrapolar la lectura obtenida en nuestra muestra, con el objetivo de determinar la concentración exacta de ese antígeno en la misma.

Las concentraciones de insulina plasmática para los animales del segundo estudio se determinaron gracias al Kit de ELISA *EZRMI-13K* de Millipore; para el análisis de los niveles de adiponectina plasmática se realizó el kit de ELISA *EZRADP-62K*; y las concentraciones de FGF21 plasmática se determinaron mediante el kit de ELISA *RD291108200R* de BioVendor, siguiendo en los 3 casos las instrucciones del fabricante. Este último kit también se utilizó para la determinación de los niveles de FGF21 de los animales del estudio 1.

3) ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS HEPÁTICOS Y MUSCULARES

3.1) Niveles de triglicéridos totales en hígado y en tejido muscular

Para la determinación del contenido de triglicéridos en el hígado y en el tejido muscular, se pesaron unos 200 mg de tejido congelado y se homogeneizaron en 800 µl de suero fisiológico usando el *Polytron® PT 10-35*. Seguidamente, al homogeneizado se le añadió 3.5 ml de reactivo *Bligh & Dyer*¹ y se agitó en un vórtex durante un minuto. A continuación, se añadió 1 ml de H₂O bidestilada y 1 ml de CHCl₃ y se agitó de nuevo. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se aisló la fase inferior, correspondiente a la fracción orgánica, con una pipeta Pasteur. Esta fase orgánica se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se almacenó a -20°C hasta la posterior determinación de la concentración de triglicéridos mediante el kit colorimétrico *Triglycerides-LQ* de la casa comercial Spinreact. Previamente a esta determinación, las muestras secas almacenadas se resuspendieron con 40 µl de etanol absoluto.

3.2) Composición de ácidos grasos en hígado. Actividad SCD1

¹ El reactivo Bligh & Dyer consiste en una mezcla de metanol y cloroformo en una relación 2:1 (v/v).

Se determinó la composición, tanto cuantitativa como cualitativa, de los tipos de ácidos grasos presentes en hígado. Este análisis se realizó en el *Lipid Clinic; Endocrinology and Nutrition Service* (director: Emili Ros), del Hospital Clínico de Barcelona, gracias a la colaboración del Dr. Aleix Sala-Vila.

A partir de estos datos, se calculó la actividad hepática del enzima estearoil coenzima A desaturasa 1 (SCD1), mediante el ratio producto/sustrato de este enzima; o lo que es lo mismo, relación de ácido palmitoleico/ácido palmítico.

4) DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPÁTICA DE β -OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Este ensayo, descrito por Lazarow (1981) permite medir la actividad de β -oxidación de los ácidos grasos. El extracto utilizado para llevar a cabo esta determinación es el sobrenadante postnuclear de hígado de rata, en el cual se encuentran las mitocondrias y los peroxisomas.

4.1) Obtención del sobrenadante postnuclear

Para la obtención del sobrenadante postnuclear, se pesó 1 gramo de hígado fresco y se le añadieron 5 ml de tampón de homogeneización (tabla IV-1). Una vez homogeneizadas (mediante el uso del homogeneizador Potter-Elvehjem), las muestras se centrifugaron a 700 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se almacenó a -80°C hasta su posterior utilización, y su concentración proteica se determinó mediante el método de Bradford, explicado más adelante (apartado 7.3).

Reactivo	Concentración
KH ₂ PO ₄ pH 7.4 (Scharlab)	50 mM
NaCl (Sigma-Aldrich)	150 mM
DTT (Sigma-Aldrich)	1 mM
EDTA (Sigma-Aldrich)	30 mM
Sacarosa (Panreac)	0.25 M
Agua bidestilada	c.s.

Tabla IV-1. Reactivos y volúmenes utilizados en la preparación del tampón de homogeneización para la obtención del sobrenadante postnuclear.

4.2) Ensayo de β -oxidación

Se partieron de 30 μg de sobrenadante postnuclear de hígado de cada rata, a los cuales se les añadió todos los reactivos necesarios para la conversión del derivado insoluble palmitoil-CoA marcado con ^{14}C en el ácido soluble acetil-CoA- ^{14}C , detectado al final del proceso. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 500 μl y los reactivos y concentraciones necesarias se indican a en la siguiente tabla (tabla IV-2):

Reactivo	Concentración
NAD (Sigma-Aldrich)	200 mM
FAD (Sigma-Aldrich)	10 mM
DTT (Sigma-Aldrich)	1 mM
BSA (Sigma-Aldrich)	75 $\mu\text{g/ml}$
CoA (Sigma-Aldrich)	100 μM
L-carnitina (Sigma-Aldrich)	1 mM
Palmitoil-CoA (Sigma-Aldrich)	10 μM
Sacarosa (Panreac)	0.25 M
Tris-HCl 50 mM pH 8 (Applichem)	c.s.

Tabla IV-2. Reactivos y volúmenes utilizados en el ensayo de β -oxidación de los ácidos grasos.

A la mezcla de todos estos reactivos se le adicionó 0.3 μl (15 nCi) de palmitoil-CoA- ^{14}C (Amersham Biosciences) para cada tubo de reacción y, posteriormente, se le añadió la muestra correspondiente de sobrenadante postnuclear. Después de agitar los tubos en un vórtex, las muestras se incubaron a 37°C en un baño de agua durante un tiempo de 11 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron 250 μl de ácido perclórico frío al 7% para detener la reacción de oxidación de los ácidos grasos, y se incubaron los tubos durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 100 xg durante 2 minutos a 4°C, para separar el palmitoil-CoA- ^{14}C (insoluble) que no había reaccionado del producto de reacción acetil-CoA- ^{14}C (soluble).

Finalmente, se transfirieron 500 μl del sobrenadante a un vial de centelleo con 5 ml de líquido de centelleo (Ultima GoldTM MV, PerkinElmer), para llevar a cabo la lectura de la radioactividad en un contador de centelleo (LKB Wallac 12A). Los resultados se expresan en nmol de palmitoil-CoA- ^{14}C oxidado/min/mg proteína.

5) VALORACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL HÍGADO

Se enviaron muestras de hígado a la *Unidad de Análisis Histopatológico y Banco de Tumores* (BioBanc) del Hospital Clínico de Barcelona, para el estudio de una posible necrosis, fibrosis o esteatosis en este tejido. Las muestras de tejido hepático destinadas a la tinción Oil Red O se mantuvieron conservadas en OCTTM (Tissue-Tek®), mientras que aquellas muestras destinadas a las tinciones de hematoxilina-eosina y Masson se conservaron en tubos falcón con formol al 10% para la elaboración de bloques de parafina y su posterior análisis.

5.1) Tinción con hematoxilina y eosina

La tinción con hematoxilina y eosina se basa en una doble coloración de las estructuras celulares. La hematoxilina, principalmente básica, se une a estructuras basófilas como los ácidos nucleicos, otorgándoles una coloración azulada; mientras que la eosina tiñe componentes acidófilos como por ejemplo el citoplasma celular, otorgando un color que va de rosado a rojizo. Este método fue el utilizado para evidenciar la existencia de necrosis en el tejido hepático.

5.2) Tinción tricrómica de Masson

Este tipo de tinción permite visualizar fibras de colágeno tipo I, así como las fibras reticulares, por lo que se utilizó para el diagnóstico de la fibrosis hepática. La técnica se basa en el uso de tres colorantes: hematoxilina férrica, fucsina ácida y azul de anilina, para diferenciar núcleos celulares (marrón), citoplasma (rojo) y fibras de colágeno (azul).

5.3) Tinción con Oil Red O

El Oil Red O (ORO) se trata de un compuesto liposoluble que permite teñir triglicéridos, lípidos y lipoproteínas, por lo que esta tinción se utiliza para detectar una posible esteatosis en muestras de tejido. El área de tinción por Oil Red O, y por lo tanto de esteatosis, se calcula como el porcentaje de células teñidas en relación con el área total de cada muestra.

Los resultados del análisis realizado en el Hospital Clínico se interpretaron según la siguiente tabla diagnóstica (tabla IV-3):

Tipo de lesión	Grado de lesión	Descripción
Necrosis	0	Negativa
	1	Escasa (<1%)
	2	Leve (< 5%)
	3	Moderada (< 10%)
	4	Severa (≥ 10%)
Fibrosis	0	Negativa
	1	Expansión fibrosa portal sin septos y/o en la vena cava y/o fibrosis sinusoidal y/o intercelular
	2	Entre uno y algunos septos
	3	Numerosos septos, sin cirrosis
	4	Cirrosis
Esteatosis	%	Contenido lipídico

Tabla IV-3. Diagnóstico utilizado en la valoración histopatológica de muestras de hígado.

6) Determinación de los niveles de mRNA

6.1) Obtención de RNA total

6.1.1) Aislamiento a partir de tejido hepático

Para la obtención del RNA hepático se pesaron 60 mg de tejido congelado y se homogeneizaron con 1 ml de TRIzol® (Life Technologies) mediante un homogeneizador eléctrico (Potter-Elvehjem). Las muestras homogeneizadas se transfirieron a tubos de polipropileno libres de RNAsas y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Pasado este tiempo, se añadieron 200 µl de cloroformo (Scharlab) y se agitaron los tubos vigorosamente durante 15 segundos, para una posterior incubación de 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12000 xg durante 15 minutos a 4°C. Seguidamente, se transfirió la fase superior acuosa resultante de la centrifugación a un nuevo tubo, al que se le añadió 500 µl de isopropanol (Scharlab). Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la precipitación del RNA y se centrifugaron de nuevo a 12000 xg durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se limpió con 1 ml de etanol al 75% (v/v). Las muestras se centrifugaron a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C y, después de descartar el sobrenadante, se dejó secar el *pellet* de RNA durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se resuspendió el *pellet* con 150 µl de agua DEPC². Por último, se incubaron las muestras a 60°C durante 10 minutos a 55-60°C y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

6.1.2) Aislamiento a partir de tejido muscular

El aislamiento de RNA a partir de tejido muscular fue muy similar al descrito anteriormente para la obtención de RNA de tejido hepático, realizando unas pequeñas modificaciones debido a la consistencia más fibrosa que presenta este tejido. El músculo elegido para la obtención de RNA fue el soleus, obtenido el día del sacrificio.

Se pesaron 150 mg de tejido congelado y se homogeneizaron con 1 ml de TRIzol, esta vez mediante el *Polytron*® PT 10-35. A partir de aquí, el procedimiento fue similar al de la extracción de RNA de tejido hepático, pero realizando una centrifuga inicial tras la homogeneización de 12000 xg durante 10 minutos a 4°C, con el objetivo de eliminar material no homogeneizado. Otro cambio realizado, fue una doble extracción clorofórmica, con el fin de limpiar al máximo posibles restos de fenol que posteriormente podrían interferir en la calidad y pureza del RNA extraído. Finalmente, se realizó un doble lavado del *pellet* de RNA con etanol al 75% (v/v) y se resuspendió en 50 µl de agua DEPC.

6.1.3) Aislamiento a partir de tejido adiposo

² El agua DEPC es agua bidestilada, por cada mL de la cual se añade 1 µL de reactivo DEPC (dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich), y autoclavada dos veces.

Para el aislamiento de RNA a partir de tejido adiposo visceral se realizó primero un paso de micronización en nitrógeno líquido. De esta forma, el rendimiento de extracción al final del proceso fue mayor. Una vez que el tejido se encontraba micronizado, se añadió 1 ml de TRIzol® y el protocolo de extracción de RNA posterior fue similar al realizado para la obtención de RNA hepático. En el paso final del mismo, el *pellet* de RNA se resuspendió en 50 µl de agua DEPC.

6.1.4) Cuantificación

Para determinar la concentración de RNA de las muestras obtenidas se realizó una lectura de la absorbancia de las mismas gracias al lector *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific). De esta manera, gracias a la lectura a 230, 260 y 280 nm, se calcularon las relaciones 260/230 y 260/280 con el fin de valorar la integridad del RNA extraído, así como descartar cualquier contaminación en las muestras por restos de fenol, proteínas o DNA genómico.

6.1.5) Integridad del RNA

Para comprobar cualitativamente la integridad del RNA de las muestras, éstas se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v), la composición del cual se describe en la tabla siguiente (tabla IV-4):

Reactivo	Concentración
Agarosa (Bioron)	400 mg
TBE 1X	40 ml
Bromuro de etidio (Gibco BRL)	1 µl

Tabla IV-4. Reactivos y proporciones utilizadas en la elaboración del gel de agarosa al 1%.

En cada pozo del gel se cargó el volumen de muestra correspondiente a 1 µg de RNA, llevado hasta un volumen final de carga de 6 µl con agua DEPC y 1 µl de tampón de carga 6X. El tampón de electroforesis utilizado es TBE 1X, preparado a partir de una solución madre de TBE 5X, la cual contiene Tris base (AppliChem) 340 mM, ácido bórico (Panreac) 440 mM, EDTA (Sigma-Aldrich) 10 mM y agua destilada c.s. Por otro lado, el tampón de carga 6X contiene 0.25% (p/v) azul de bromofenol (Sigma-Aldrich), 0.25% (p/v) de xilenol (Sigma-Aldrich) y 40% (p/v) de sacarosa (Panreac) en agua bidestilada y autoclavada.

Una vez cargado el gel, la electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V durante 30 minutos y a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se observó el gel bajo una lámpara de luz ultravioleta (*MiniBIS Pro*, DNR Bio-Imaging Systems), comprobando así la presencia de dos bandas bien definidas correspondientes al RNA ribosómico (subunidades 28S y 18S).

6.2) Reacción de retrotranscripción

La reacción de la transcriptasa inversa, o reacción de retrotranscripción (RT), permite sintetizar una cadena de DNA complementaria (cDNA) a partir de una molécula de mRNA, y es catalizada por el enzima transcriptasa inversa, una DNA polimerasa dependiente de RNA. Para ello, se utilizan como cebadores pequeñas cadenas de nucleótidos (llamados *Random Hexamers*) que permiten el inicio de la síntesis de esta nueva cadena de cDNA.

Los reactivos utilizados para cada reacción de retrotranscripción, así como las proporciones necesarias, se muestran en la tabla siguiente (tabla IV-5):

Reactivo	Concentración
Random Hexamers (Roche)	125 ng
dNTPs (Sigma-Aldrich)	500 µM (cada uno)
Tampón 5X <i>First Strand</i> (Invitrogen)	1X (50 mM Tris HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl ₂)
DTT (Invitrogen)	10 mM
M-MVL-RT (Invitrogen)	200 U
RNAse Out (Invitrogen)	20 U
RNA total	1 µg
Agua DEPC	c.s. 20 µl

Tabla IV-5. Reactivos y proporciones utilizadas en la reacción de retrotranscripción. (MVL-RT: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase).

Los tubos con la mezcla de estos reactivos con la correspondiente muestra de RNA, se dispusieron en un termociclador (*MJ Mini™ Personal Thermal Cycler*, Bio-Rad), que se programó a 37°C durante 1 hora, con el fin de que tuviese lugar la reacción de retrotranscripción. El cDNA resultante se conservó a -20°C hasta su posterior utilización.

6.3) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR permite la amplificación de una determinada secuencia de DNA hasta niveles en que pueda ser fácilmente detectable. Para llevarse a cabo, se necesita el enzima DNA polimerasa para la síntesis de nuevas moléculas de DNA y dos oligonucleótidos específicos o cebadores, complementarios a secuencias presentes en cada una de las cadenas de DNA y que limitan el fragmento de DNA a amplificar. La reacción de PCR consiste en una desnaturalización del DNA molde, seguida de la hibridación de los oligonucleótidos específicos a sus secuencias complementarias y de la posterior extensión de la cadena de DNA por acción del enzima DNA polimerasa. Las cadenas resultantes sirven de molde en los ciclos siguientes, obteniéndose de esta forma después de n ciclos, 2^n moléculas de la secuencia de DNA deseada. En el presente trabajo, la reacción de PCR se llevó a cabo con la finalidad de amplificar determinadas moléculas de cDNA obtenidas mediante la reacción de la transcripción.

6.3.1) Real Time PCR

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La técnica de Real Time PCR (PCR en tiempo real) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa en la que se emplea, al igual que en ésta, una cadena molde de DNA, un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción y el enzima DNA polimerasa. Pero además, en el caso de la Real Time se añade una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que contenga sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de un producto específico. Esta medición se realiza después de cada ciclo de amplificación, de ahí el nombre de PCR a tiempo real.

En el presente estudio, la reacción de PCR a tiempo real se realizó en un volumen final de 20 μ l por pozo, en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems). En cada pozo de reacción se añadió 10 μ l de *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0.4 μ l de una mezcla de cebadores (en la que se incluye el cebador sentido y el antisentido, a una concentración final de 100 nM cada uno) y 10 ng de cDNA diluido en 9.6 μ l de agua autoclavada.

Las muestras fueron incubadas en el termociclador *StepOnePlusTM Real-Time PCR System Thermal Cycling Block* (Applied biosystem). Se realizó un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificación. Cada uno de estos ciclos consistió en 15 segundos a 95°C, seguidos por 60 segundos a 60°C. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo por duplicado y fueron normalizadas con genes control (*tbp* en el caso de muestras de hígado, *18s* en el caso del tejido adiposo y *aprt* en el caso de muestras de tejido muscular y cultivos celulares), mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Los cebadores para la PCR a tiempo real de este estudio se diseñaron con el software *Primer ExpressTM 2.0* (Applied Biosystems). Dentro de los parámetros deseados para el diseño de estos cebadores se seleccionó, siempre que fuera posible, un amplicón de un tamaño de entre 70 y 150 bp, y que la temperatura de *melting* fuera entre 59 y 61°C. Además, se procuró que dichos cebadores fueran multi-exonales, para evitar la amplificación de DNA genómico. Se realizaron experimentos preliminares con el objetivo de optimizar las condiciones de PCR para cada uno de los genes estudiados. Las secuencias de los primers utilizados en este trabajo se detallan en las tablas siguientes (tabla IV-6 y tabla IV-7):

Gen (NCBI Reference)	Secuencias sentido	Secuencia antisentido	Tamaño
----------------------	--------------------	-----------------------	--------

11b-HSD1 (NM_017080.2)	5'-TGCTCTGGATGGGTTCTTTT-3'	5'-GAAGCCGAGGACACACAGAGAG-3'	88 pb
aco (NM_017340.2)	5'-GTGAGGCGCCAGTCTGAAA-3'	5'-ACTGCTGGGTTTAAAAATCCA-3'	70 pb
aprt (NM_001013061.1)	5'-GGATATCTCGCCCTCTTGAA-3'	5'-CAAGGGAAGGGCCAAACAG-3'	146 pb
chop (NM_001109986.1)	5'-TGACCCTGCATCCATAGCTT-3'	5'-GCTTTGGGAGGTGCTTGTGA-3'	70 pb
cpt1α (NM_031559.2)	5'-TGCAGAACACGGCAAAATGA-3'	5'-CCGACCTGAGAGGACCTTGA-3'	70 pb
cpt1β (NM_013200.1)	5'-CAGTGTGCCAGCCACAATC-3'	5'-TAGGCTTCGTCATCCAGCA-3'	66 pb
colla1 (NM_001134530.1)	5'-TTTGTGCTAAACCAGGAGATATTA-3'	5'-TGGCTGGATGGGATTGG-3'	72 pb
dgat (NM_001012345.1)	5'-GGAACCGCAAGGCTTTGTA-3'	5'-GGAATAGTGGGAACCAGATCA-3'	65 pb
dnajb9 (NM_012699.2)	5'-CCAATCGACGCACAGTACAGA-3'	5'-TTCCTCTCCGCTGAGTGA-3'	82 pb
edem1 (XM_001075943.4)	5'-CCGTTTCATTTGACAAAGATCC-3'	5'-CAGAAAGGAGGCTTCCCAGAA-3'	75 pb
fas (NM_017332.1)	5'-GGCTCTATGGTTGCCTAAGC-3'	5'-GGTGGACCCCAAAAAGGA-3'	78 pb
g6pc (NM_013098.2)	5'-GGCTACCTTTCCCATCAGG-3'	5'-ATCCAAGTCCGAAACCAACAG-3'	146 pb
g6pdh (NM_017006.2)	5'-CAGGCCAACCGTCTGTCTAC-3'	5'-GAATGTTCTTGGTGACTGCTCAT-3'	67 pb
gapdh (NM_017008.4)	5'-CCCCAATGATCCGTTGTG-3'	5'-CCACCTCTTGATGTCATCATACTG-3'	75 pb
glut4 (NM_012751.1)	5'-ACTCATTCTCGGACGGTCTCT-3'	5'-CTCCACATACATAGGCACCA-3'	74 pb
glut5 (NM_031741.1)	5'-TCCTCCAGATGGGTACAACGT-3'	5'-CTTGTCTGCTGATAGGTGTCATT-3'	93 pb
gpat (NM_017274.1)	5'-GCCTTGGCCGATGTAACAC-3'	5'-CGGATCTGAAGAAGTAGGTTGA-3'	72 pb
gpr119 (NM_181770.1)	5'-CCTGCTCTGGTCTCCGTTTC-3'	5'-CTTGGTAGAGCCAGCATTGTG-3'	71 pb
gpr78 (NM_013083.2)	5'-TGATAATCAGCCACCGTAACA-3'	5'-CAAATGTACCCAGAAGGTGATTGTC-3'	83 pb
gpx1 (NM_030826.3)	5'-TCGTTTCCCGTGAATC-3'	5'-TGAGGGAATTGAAATCTTCTTCT-3'	69 pb
grp94 (NM_001012197.2)	5'-AAGGCTCACGGACAGACGAT-3'	5'-CCTTATTTGTGATGCATTTAAACCA-3'	83 pb
hnf4 (NM_022180.2)	5'-GTCCATGTTGTTCAAGGATGTG-3'	5'-TCATCTCTGCTAGCTCTGGACAGT-3'	80 pb
ikb (NM_001105720.2)	5'-GTGAGGATGAGGAGAGCTATGACA-3'	5'-CCTCAAACACACAGTCATCGT-3'	79 pb
ldh (XM_003750458.2)	5'-GGCTGTGCCATCAGTATCTTAATG-3'	5'-CCCTTAGCTTATCTTCTATGACATCA-3'	81 pb
leptina (ob) (NM_013076.3)	5'-GGTCACCGTTTGGACTTCA-3'	5'-GGTCTGTCCATCTTGGACAA-3'	67 pb
lpk (NM_012624.3)	5'-GAACATTGACGACTCAACTTCTC-3'	5'-CGGATGTTGGCGATGGAT-3'	69 pb
mcp-1 (NM_031530.1)	5'-CTGTCTCAGCCAGATGCAGTTAA-3'	5'-TGGGATCATCTTGCCAGTGA-3'	69 pb
mt-co1 (NM_21092007.1)	5'-GCAGGATACCTCGTCTACT-3'	5'-CCGTAAGTGAGATGAATGAGCCTAT-3'	91 pb
mt-1 (NM_138826.4)	5'-CTCCTGCACCTGCTCCAGCTC-3'	5'-AGGCACAGCAGTGCCTTGT-3'	152 pb
mt-2 (NM_001137564.1)	5'-TGTGCCACAGATGGATCCTGC-3'	5'-CAGCAGCTGCCTTGTCCGAA-3'	161 pb
myd88 (NM_198130.1)	5'-GCCAGCGAGCTCATTGAGA-3'	5'-TTTGCAGGTAATCGTCAGAAACA-3'	67 pb
nlrp3 (NM_001191642.1)	5'-GAGCTACACCCAGCTCCAA-3'	5'-GTCAAGAGTTTCTGCTCCCTTTC-3'	70 pb
nrf2 (XM_006234396.2)	5'-TGAAGACTGTATGCAGCTTTGG-3'	5'-GGCAAGCGACTGAAATGTAGGT-3'	85 pb
pai-1 (NM_012620.1)	5'-TGGCTCAGAACAACAAGTTCAAC-3'	5'-GGCAGTTCAGGATGTCGACT-3'	76 pb
pdk4 (NM_053551.1)	5'-GATGGACAATTCACGGAATGC-3'	5'-TGGCGTAGAGACGGGAAATC-3'	71 pb
pepck (NM_198780.3)	5'-ACGGTGGGAACCTACTGCTTG-3'	5'-TGCCTTCGGGGTTAGTTATGC-3'	123 pb
pgc1α (NM_031347.1)	5'-CAGAACAACCCTGCCATTGTT-3'	5'-GCTTTTGCTGTTGACAAATGCT-3'	77 pb
pmrt1 (NM_024363.1)	5'-GAGGTGCGAACCTCACGTA-3'	5'-CATCCAGCACCTTGTCTT-3'	76 pb
ppara (NM_013196.1)	5'-TGGAGTCCACCGATGTGAAG-3'	5'-CGCCAGCTTTAGCCGAATAG-3'	64 pb
pparβ (NM_013141.2)	5'-GAGCATCCTCACTGGCAAGTC-3'	5'-TGCCACAGCGTCTCAATGTC-3'	69 pb
rps18 (18s) (NM_213557.1)	5'-TGGGCGCGGAAAATAG-3'	5'-TCAACACCACATGAGCGTATCTC-3'	74 bp
ruvb1 (NM_147177.1)	5'-AAGACAGAGGTGCTGATGGAGAA-3'	5'-CCTTCATAAACCTCTTAGTCTCCTTT-3'	77 pb
scd1 (NM_139192.2)	5'-CAGAGCCAGGTGCCACTTTT-3'	5'-TGCTAGAGGGTGTACCAAGCTTT-3'	104 pb
sec61α1 (NM_199256.2)	5'-CCCGAAAGACCGAGCTCTCT-3'	5'-CAATGGACTGACCGATAGTATG-3'	74 pb
sod2 (NM_017051.2)	5'-CGTCACCGAGGAGAAGTACCA-3'	5'-AGGCTGAAGAGCAACCTGAGTT-3'	70 pb
tbp (NM_001004198.1)	5'-TGGGATTGTACCACAGCTCCA-3'	5'-CTCATGATGACTGCAGCAAACC-3'	132 pb
tlr-4 (NM_019178.1)	5'-TTGTTCTTCTGCTGAGA-3'	5'-TGATCCATGCATTGGTAGTAATATT-3'	83 pb
tnfa (NM_012675.3)	5'-ATCCGAGATGTGGAAGTGGC-3'	5'-CGATCACCCGAAGTTCAGTA-3'	151 pb
tti1 (NM_001134619.1)	5'-GACGTGATGGAGCGTGTATC-3'	5'-ACAATCCAGCAGTCCAA-3'	82 pb

Tabla IV-6. Oligonucleótidos específicos utilizados en la reacción de PCR para muestras de rata y tamaño del amplicón resultante en pares de bases (pb).

Gen (NCBI Reference)	Secuencias sentido	Secuencia antisentido	Tamaño
aprt (NM_009698.2)	5'-TCCCGACTTCCCAATCC-3'	5'-AAGGAGTCCGGGTTTCAAG-3'	64 pb
fk (NM_008439.3)	5'-TCATCAATGTGGTGGACAAATACC-3'	5'-CCTCCAGCTGCCATCTCT-3'	76 pb
glut5 (XM_006539076.2)	5'-ACCTGCCTCATAGCCTGCTTAG-3'	5'-GGCATCCAGGAGATGGTGT-3'	68 pb
gpr119 (NM_181751.2)	5'-CAACCCACTCATCTATGCTATTG-3'	5'-TCCCAGGGCCATGTGGTA-3'	67 pb

Tabla IV-7. Oligonucleótidos específicos utilizados en la reacción de PCR para muestras de células C₂C₁₂ y tamaño del amplicón resultante en pares de bases (pb).

6.3.2) Visualización del producto de PCR por tinción con bromuro de etidio

Para la determinación concreta del procesamiento del RNA de XBP1, se llevó a cabo una PCR convencional seguida de una electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v), así como de una posterior visualización de las bandas bajo la luz UV (*MiniBIS Pro*, DNR Bio-Imaging Systems).

Los oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación de XBP1 en el hígado de rata fueron 5'-GGACACGCTTGGGGATGAATG-3' (sentido) y 5'-GTGACAACTGGGCCTGCACCT-3' (antisentido), y el producto de PCR obtenido después de 29 ciclos de amplificación fue de 150 pares de bases.

La PCR se realizó con los reactivos descritos en la siguiente tabla (tabla IV-8):

Reactivo	Concentración
Tampón de PCR 10X (Invitrogen)	1X (20 mM Tris HCl pH 8.4, 50 mM KCl)
MgCl ₂ (Invitrogen)	1.2 mM
dNTPs (Sigma-Aldrich)	160 μM (cada uno)
Taq DNA polimerasa (Invitrogen)	1 U
Oligonucleótido sentido (Roche Diagnostics)	0.5 μg
Oligonucleótido antisentido (Roche Diagnostics)	0.5 μg
cDNA	5 μl
Agua DEPC	c.s. 50 μl

Tabla IV-8. Reactivos y proporciones utilizadas en la reacción de PCR para XBP1s.

6.4) Detección de los niveles de miR33

Para la detección de los niveles de miRNAs en muestras de hígado, éstas fueron enviadas al *Laboratorio de Patologías del Metabolismo Lipídico y Nutrición Molecular* del instituto IMDEA Alimentación (Madrid), bajo la atención del Dr. Alberto Dávalos, donde se procedió a la extracción de este tipo de RNA para su posterior análisis. Para ello, se aislaron los miRNAs gracias al kit de *extracción miRNeasy minikit* (Qiagen). Para su cuantificación, las muestras de miRNAs fueron retrotranscritas mediante el kit *miScript II reverse transcription kit* (Qiagen). Para la amplificación, se utilizaron oligonucleótidos específicos para miR33 (Qiagen) y se realizó una PCR en tiempo real usando el kit *miScript SYBR Green PCR Kit* (Qiagen) en el termociclador *7900 HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). La expresión relativa de miR33 se calculó gracias al método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando los niveles de *RNU6* para su normalización.

7) Inmunodetección de proteínas

7.1) Obtención de extractos proteicos totales

Para la obtención de extractos proteicos totales a partir de muestras de tejido congelado se siguió el protocolo descrito por Helenius y colaboradores (1996), aplicando unas pequeñas modificaciones para adaptar la extracción al tejido de origen.

7.1.1) Aislamiento a partir de tejido hepático y muscular

Se partió de una muestra de aproximadamente 100 mg de tejido congelado, que se homogeneizó con 1 ml de tampón de lisis mediante el homogeneizador eléctrico *Polytron® PT 10-35*. Seguidamente, se transfirió el homogenado a un tubo de polipropileno y se incubó en rotación constante durante 2 horas, a 4°C. Pasado este tiempo, se centrifugaron las muestras a 15000 xg durante 15 minutos a 4°C y se guardó el sobrenadante a -80°C para su posterior utilización. La concentración de proteína en el extracto se determinó siguiendo el método de Bradford, descrito en el apartado 7.3.

La composición del tampón de lisis, que contenía inhibidores de proteasas, desacetilasas y fosfatasas, fue la que se indica en la siguiente tabla (tabla IV-9):

Reactivo	Concentración
Tris-HCl pH 8 (AppliChem)	50 mM
NaCl (Sigma-Aldrich)	150 mM
Igepal® (Sigma-Aldrich)	1 %
NaF (Sigma-Aldrich)	100 mM
EDTA (Sigma-Aldrich)	1 mM
EGTA (Sigma-Aldrich)	1 mM
Nappi (Sigma-Aldrich)	2 mM
PMSF (Sigma-Aldrich)	1 mM
Aprotinina (Sigma-Aldrich)	2 µg/ml
Leupeptina (Sigma-Aldrich)	2 µg/ml
Na ₃ VO ₄ (Sigma-Aldrich)	1 mM
NAM (Sigma-Aldrich)	10 mM
TSA (Sigma-Aldrich)	1 µM
Agua bidestilada	C.S.

Tabla IV-9. Reactivos utilizados en la extracción de proteína total en muestras de tejido hepático y muscular de rata.

El músculo destinado a la obtención de extracto de proteína total fue el músculo cuádriceps, extraído el día del sacrificio del animal.

7.1.2) Aislamiento a partir de tejido adiposo

Para el aislamiento de proteína a partir de tejido adiposo visceral, se realizó un primer paso de micronización en nitrógeno líquido, tal y como se hizo para la extracción de RNA a partir de este mismo tejido. De esta forma, el rendimiento de extracción al final del proceso fue mayor. Una vez que el tejido se encontraba micronizado, se añadieron 300 µl de tampón de lisis (formado por los mismos reactivos y en las mismas proporciones que los descritos en el apartado anterior), y el protocolo de extracción de proteína total posterior fue similar al realizado para la obtención de proteína total hepática y muscular. La concentración de proteína total en el extracto se determinó siguiendo el método de Bradford.

7.2) Obtención de extractos nucleares a partir de tejido hepático y muscular

Para la obtención del extracto nuclear a partir de tejido congelado se partió de una muestra de aproximadamente 150 mg, a la que se le añadieron 4 volúmenes (4V, p/v) de tampón de homogeneización (tabla IV-10). Esta muestra se homogeneizó con el homogeneizador eléctrico *Polytron® PT 10-35*, se transfirió a un tubo de polipropileno y se incubó 10 minutos en hielo. Pasado ese tiempo, se realizó una centrifuga de 2000 xg durante 10 minutos a 4°C, con el objetivo de precipitar los núcleos.

Tras esta centrifuga, el *pellet* obtenido se resuspendió de nuevo con 4V de tampón de homogeneización y se centrifugó una vez más a 2000 xg durante 10 minutos a 4°C. El *pellet* resultante fue resuspendido con 2V de tampón de lisis (tabla IV-11). Posteriormente, la muestra se incubó 90 minutos en rotación constante a 4°C y, finalmente, se centrifugó a 25000 xg durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante fue transferido a otro tubo de polipropileno y se determinó su concentración proteica gracias a la técnica de Bradford.

Reactivo	Concentración
Tris-HCl pH 8 (AppliChem)	10 mM
MgCl ₂ (Panreac)	1.50 mM
KCl (Fisher Scientific)	10 mM
DTT (Invitrogen)	0.5 mM
Nappi (Sigma-Aldrich)	2 mM
NaF (Sigma-Aldrich)	100 mM
PMSF (Sigma-Aldrich)	1 mM
Aprotinina (Sigma-Aldrich)	2 µg/ml
Leupeptina (Sigma-Aldrich)	2 µg/ml
Na ₃ VO ₄ (Sigma-Aldrich)	1 mM
NAM (Sigma-Aldrich)	10 mM
TSA (Sigma-Aldrich)	1 µM
Agua bidestilada	c.s.

Tabla IV-10. Reactivos y proporciones utilizadas para la elaboración de tampón de homogeneización utilizado en la extracción de proteína nuclear en muestras de tejido hepático y muscular de rata.

Reactivo	Concentración
Tris-HCl pH 8 (AppliChem)	50 mM
NaCl (Sigma-Aldrich)	150 mM
Igepal® (Sigma-Aldrich)	1 %
NaF (Sigma-Aldrich)	100 mM
EDTA (Sigma-Aldrich)	1 mM
EGTA (Sigma-Aldrich)	1 mM
Nappi (Sigma-Aldrich)	2 mM
PMSF (Sigma-Aldrich)	1 mM
Aprotinina (Sigma-Aldrich)	2 µg/ml
Leupeptina (Sigma-Aldrich)	2 µg/ml
Na ₃ VO ₄ (Sigma-Aldrich)	1 mM
NAM (Sigma-Aldrich)	10 mM
TSA (Sigma-Aldrich)	1 µM
Agua bidestilada	c.s.

Tabla IV-11. Reactivos y proporciones utilizadas para la elaboración de tampón de lisis utilizado en la extracción de proteína nuclear en muestras de tejido hepático y muscular de rata.

7.3) Determinación de la concentración de proteína: Método de Bradford

Para la determinación de la concentración de proteína se utilizó el método Bradford (1976) adaptado a la lectura en microplaca. Se trata de un método colorimétrico basado en el hecho de que la absorbancia máxima de la solución ácida *Coomassie Blue G-250* cambia de 465 a 595 nm cuando tiene lugar la unión de la proteína en cuestión, momento en el cual la coloración marrón vira a un tono azulado. La concentración de proteína se determina por interpolación en una recta de calibrado preparada con albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) como patrón (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 µg/µl).

En cada pozo de la microplaca se añadieron 10 µl de la solución patrón o de la muestra y 190 µl del reactivo de Bradford (Bio-Rad), previa dilución 1:5 con agua bidestilada. Después de dejar reaccionar los reactivos durante 10 minutos, se determinó la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro de microplaca (*Bio-Rad Benchmark Plus*).

7.4) Ensayo de Western Blot

La técnica de Western Blot permite la separación de las proteínas en un gel de poliacrilamida (PAGE) en función de su peso molecular. Esta técnica consta de un primer paso de electroforesis, llevado a cabo en condiciones de desnaturalización en presencia de SDS (dodecilsulfato sódico). Posteriormente, las proteínas se transfieren del gel a una membrana de fluoruro de polivinideno (PVDF) y dicha membrana se incuba con un anticuerpo específico, permitiendo así su posterior detección por quimioluminiscencia.

7.4.1) Electroforesis

Los geles utilizados en la electroforesis constan de dos fases: un gel concentrador, con un bajo porcentaje de acrilamida-bisacrilamida (3-5%) y que permite concentrar las proteínas cargadas en el gel en una banda fina y definida, y un gel separador, más concentrado (8-12%), en el cual se separan las proteínas en función de su peso molecular. El peso molecular de las proteínas que se quieren analizar condiciona el porcentaje de acrilamida-bisacrilamida del gel separador.

Los reactivos y los volúmenes necesarios para la elaboración de 2 geles de acrilamida-bisacrilamida en el sistema *MiniProtean III* (Bio-Rad) se especifican en la tabla siguiente (tabla IV-12):

Reactivo	Gel concentrador (4%)	Gel separador (8%)
	Volumen	Volumen
Acrilamida-bisacrilamida 40% (AppliChem)	750 μ l	4.50 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 (AppliChem)	-----	5.63 ml
Tris-HCl 1M, pH 6.8 (AppliChem)	938 μ l	-----
SDS 10%	75 μ l	255 μ l
APS 10% (Sigma-Aldrich)	45 μ l	300 μ l
TEMED (Sigma-Aldrich)	12 μ l	30 μ l
Agua bidestilada	c.s. 7.5 ml	c.s. 22.5 ml

Tabla IV-12. Reactivos y volúmenes necesarios en la elaboración de 2 geles para la electroforesis de proteínas en la técnica de Western Blot.

Para la preparación de las muestras, se tomó un volumen de proteína total o de extracto nuclear equivalente a 10-30 μ g de proteína (para cada proteína a analizar, previamente se realizaron estudios para determinar la cantidad de proteína a cargar en el gel, con la finalidad de que la relación cantidad de proteína cargada/señal quimioluminiscente fuese lineal) y se añadió tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5 para igualar los volúmenes y tampón de carga *sample buffer 2X*³, de manera que la concentración final de este tampón en la muestra fuese 1X.

Una vez preparadas, las muestras se llevaron a ebullición durante 5 minutos a 100°C en un baño seco (*Techne DRI-BLOCK DB-2A*), con la finalidad de desnaturalizar las proteínas. Seguidamente, se cargó el gel de electroforesis, juntamente con un marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*, Bio-RAD), que permite conocer de manera aproximada la altura del gel a la cual se encuentra la proteína de interés.

La electroforesis se realizó en una cubeta con tampón de migración (Tris base 25 mM, glicina (AppliChem) 192 mM, SDS 0.1%, H₂O bidestilada c.s.), a un voltaje constante de 100V y a temperatura ambiente.

³ La composición del *sample buffer 2X* es la siguiente: Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), β -mercaptoetanol 10% (v/v), azul de bromofenol 0.012% (p/v) y agua bidestilada c.s.

7.4.2) Transferencia

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de PVDF (162-0177; Bio-Rad) utilizando el sistema *Mini Trans-Blot*[®] (Bio-Rad). La transferencia se realizó a 4°C, durante un tiempo de 120 minutos y a una intensidad constante de 200 mA. La composición del tampón de transferencia empleado es: Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v) y agua bidestilada c.s.

7.4.3) Inmunodetección

La inmunodetección consiste en incubar la membrana en presencia de un anticuerpo primario que reconoce la proteína de interés y, seguidamente, con un anticuerpo secundario conjugado con un enzima peroxidasa. De esta forma, el anticuerpo secundario reconoce al anticuerpo primario y permite la detección de los sitios de la membrana donde se ha unido el anticuerpo primario en presencia del reactivo ECL (GE Healthcare) o ECL plus (PerkinElmer), mediante una reacción de quimioluminiscencia. El revelado de la señal quimioluminiscente se llevó a cabo con el uso de films fotográficos (*AGFA CURIX RP2*), y su cuantificación mediante el software *Quantity One*[®] (Bio-Rad).

Previamente a la incubación con el anticuerpo primario correspondiente, la membrana se bloqueó mediante una solución de TBS (Tris base 20 mM, NaCl 150 mM, H₂O bidestilada, c.s.) con un 0.1% (v/v) del detergente Tween[®]20 (TBS-T) que contenía también un 5% (p/v) de leche desnatada, durante 1 hora a temperatura ambiente.

Las condiciones de incubación y los anticuerpos utilizados para el análisis de los niveles de proteínas en el presente trabajo se resumen en las tablas IV-13 y IV-14. El tiempo de incubación utilizado para la incubación de los anticuerpos primarios fue toda la noche a 4°C, mientras que los anticuerpos secundarios fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente.

Entre los diferentes pasos de la inmunodetección (bloqueo, incubación con el anticuerpo primario, incubación con el anticuerpo secundario, adición del reactivo de ECL), se realizaron 3 lavados de la membrana con solución TBS-T de 5 minutos cada uno.

Para normalizar los resultados, se utilizaron las proteínas β -actina, β -tubulina y lámina B, reveladas en la misma membrana que la proteína de interés. En el caso de las membranas donde no se pudieron revelar estas dos proteínas (por ejemplo, membranas destinadas a la detección de proteínas con un elevado peso molecular), la uniformidad de carga se comprobó mediante la tinción de la membrana con la solución *Roig Ponceau* al 0.1% (p/v) (Sigma-Aldrich).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpo primario	Casa comercial (referencia)	Origen	Dilución utilizada
β -actin	Sigma-Aldrich (A5441)	Mouse	1:1000
β -tubulin	Sigma-Aldrich (T4026)	Mouse	1:1000
Phospho-4E-BP1 (Thr37/46)	Cell Signaling (#2855)	Rabbit	1:1000
Acetyl-CoA Carboxylase (ACC)	Cell Signaling (#3662)	Rabbit	1:500
Phospho Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) (Ser79)	Cell Signaling (#3661)	Rabbit	1:1000
Acetylated-Lysine	Cell Signaling (#9441)	Rabbit	1:1000
Akt	Cell Signaling (#9272)	Rabbit	1:1000
Phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling (#9271)	Rabbit	1:1000
AMPK α	Cell Signaling (#2532)	Rabbit	1:1000
Phospho-AMPK α (Thr172)	Cell Signaling (#2535)	Rabbit	1:1000
ATF6 α	Santa Cruz (sc-22799)	Rabbit	1:500
Phospho-AS160 (Thr642)	Cell Signaling (#8881)	Rabbit	1:1000
Beclina1	Abcam (ab16998)	Rabbit	1:1000
ChREBP	Santa Cruz (sc-33764)	Goat	1:500
Erk (p44/42 MAPK)	Cell Signaling (#9102)	Rabbit	1:1000
Phospho-Erk (P44/42 MAPK) (Thr202/Tyr 204)	Cell Signaling (#9101)	Rabbit	1:1000
FKHR (FoxO1)	Santa Cruz (sc-11350)	Rabbit	1:1000
Phospho-FKHR (FoxO1) (Ser256)	Santa Cruz (sc-101681)	Rabbit	1:500
GAPDH	Millipore (CB1001)	Mouse	1:2000
GCK (Glucokinase)	Santa Cruz (sc-7908)	Rabbit	1:500
GLUT4	Cell Signaling (#2213)	Rabbit	1:200
GPR119	Santa Cruz (sc-99103)	Rabbit	1:250
GSK3 β	Cell Signaling (#9315)	Rabbit	1:1000
Phospho-GSK3 β (Tyr216)	Abcam (ab75745)	Rabbit	1:1000
HNF4 α	Santa Cruz (sc-6556)	Rabbit	1:250
IRS1	Cell Signaling (#2382)	Rabbit	1:1000
IRS2	Santa Cruz (sc-1555)	Rabbit	1:500
IKB α	Santa Cruz (sc-371)	Rabbit	1:200
IRE1	Abcam (ab37037)	Rabbit	1:500
Phospho-IRE1 (Ser724)	Abcam (ab104157)	Rabbit	1:500
JNK	Cell Signaling (#9252)	Rabbit	1:1000
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling (#9251)	Mouse	1:500
Ketohexokinase (FK)	Santa Cruz (sc-50029)	Goat	1:1000
Lamp1	GeneTex (GTX19294)	Rabbit	1:1000
Lámina B	Santa Cruz (sc-6216)	Goat	1:500
LC3B	Cell Signaling (#2775)	Rabbit	1:1000
MKP-3	Santa Cruz (sc-377070)	Mouse	1:250
mTOR	Cell Signaling (#2972)	Rabbit	1:1000
Phospho-mTOR (Ser2481)	Millipore (#09-343)	Rabbit	1:1000
NAMPT	Abcam (ab37299)	Rabbit	1:500
(NF κ B) p65	Santa Cruz (sc-372)	Rabbit	1:500
p38 MAPK	Cell Signaling (#9212)	Rabbit	1:1000
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling (#9211)	Rabbit	1:1000
PEPCK-C	Santa Cruz (sc-74823)	Rabbit	1:1000
PERK	Santa Cruz (sc-13073)	Rabbit	1:500
Phospho-PERK (Thr981)	Santa Cruz (sc-32577)	Rabbit	1:500
PKA-C α	Cell Signaling (#4782)	Rabbit	1:1000
Phospho-PKA-C α (Thr197)	Cell Signaling (#4781)	Rabbit	1:1000
PGC1 α	Cayman (101707)	Rabbit	1:500
PPAR α	Abcam (ab8934)	Rabbit	1:1000
RagC	Cell Signaling (#5466)	Rabbit	1:1000
Rheb	Santa Cruz (sc-6341)	Goat	1:400
S6 Ribosomal Protein (rpS6)	Cell Signaling (#2217)	Rabbit	1:1000
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236)	Cell Signaling (#2211)	Rabbit	1:1000
Phospho-SGK (Ser422)	Santa Cruz (sc-16745)	Rabbit	1:400
Phospho-SGK (Thr256)	Santa Cruz (sc-16744)	Goat	1:500
SIK2	Cell Signaling (#6919)	Rabbit	1:1000
Sirt1	Santa Cruz (sc-15404)	Rabbit	1:2000
SOCS3	Santa Cruz (sc-9023)	Rabbit	1:1000
SQSTM1/p62	Abcam (ab56416)	Mouse	1:1000
SREBP-1c	Santa Cruz (sc-366)	Rabbit	1:500
Telo2	Proteintech (15975-1-AP)	Rabbit	1:1000
Phospho-TSC2 (Thr1462)	Cell Signaling (3617)	Rabbit	1:1000
Phospho-Ulk1 (Ser757)	Cell Signaling (#6888)	Rabbit	1:500
XBP1	Santa Cruz (sc-32138)	Goat	1:500

Tabla IV-13: Anticuerpos primarios utilizados en la inmunodetección de proteínas por Western blot.

Anticuerpo secundario	Casa comercial (referencia)	Dilución utilizada
Anti-Rabbit IgG HRP	Amersham (NA934)	1:3000
Anti-Mouse IgG HRP	Amersham (NA931)	1:3000
Anti-Goat IgG HRP	Santa Cruz (sc-2020)	1:3000

Tabla IV-14: Anticuerpos secundarios utilizados en la inmunodetección de proteínas por Western blot.

7.5) Análisis del grado de interacción entre dos proteínas: Técnica de co-inmunoprecipitación

Se determinó el grado de interacción entre distintas proteínas mediante la técnica de co-inmunoprecipitación (Co-IP), un tipo de inmunoprecipitación de complejos de proteínas intactas. En esta técnica, una de las proteínas que forman el complejo, es aislada por precipitación gracias a su unión con un anticuerpo específico. Posteriormente, mediante una técnica de Western Blot, se detectan los niveles de otra proteína que forma parte de ese complejo y que se encuentra unida a la primera.

Se tomaron volúmenes equivalentes a 150 μg de proteína total y se llevaron a un volumen final de 500 μl con tampón PBS con un 2% de BSA, y al que se le añadió los inhibidores que se indican en la tabla siguiente (tabla IV-15):

Reactivo	Concentración
Aprotinina (Sigma-Aldrich)	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
PMSF (Sigma-Aldrich)	1 mM
NAM (Sigma-Aldrich)	10 mM
NaF (Sigma-Aldrich)	100 mM
TSA (Sigma-Aldrich)	2 μM
Na_3VO_4 (Sigma-Aldrich)	1 mM
DTT (Invitrogen)	500 μM
Nappi (Sigma-Aldrich)	2 mM

Tabla IV-15. Reactivos y proporciones utilizadas para la elaboración de tampón PBS + 2% BSA, en la técnica de co-inmunoprecipitación.

A esta mezcla, también se añadieron 2 μg de anticuerpo específico para aquella proteína que queremos aislar por inmunoprecipitación. Las muestras se incubaron en rotación constante durante 4 horas a 4°C. Pasado ese tiempo, a las muestras se les añadieron 30 μl de *beads* de agarosa (sc-2003, Santa Cruz) y se volvieron a incubar en rotación constante durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados del complejo formado por *beads*, anticuerpo y muestra con un tampón PBS con inhibidores en la misma concentración que la tabla anterior (tabla IV-15). Después del último lavado, se resuspendió el *pellet* con 40 μl de *sample buffer 2x* y las muestras se llevaron a ebullición durante 5 minutos en un baño seco. Posteriormente, se realizó una centrifugación de las muestras a 1000 $\times\text{g}$ durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se cargó en un gel de poliacrilamida y se procedió a realización de la técnica de Western Blot anteriormente descrita.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Las condiciones de incubación de los anticuerpos primarios utilizados en la técnica de Western Blot para la Co-IP fueron las que se indican en la tabla IV-16, mientras que las condiciones de incubación de los anticuerpos secundarios fueron las mismas (y en las mismas condiciones) que los detallados en el apartado 7.4.3 (tabla IV-14).

Anticuerpo primario	Casa comercial (referencia)	Origen	Dilución utilizada
GAPDH	Millipore (CB1001)	Mouse	1:2000
mTOR	Cell Signaling (#2972)	Rabbit	1:1000
RagC	Cell Signaling (#5466)	Rabbit	1:1000
Telo2	Proteintech (15975-1-AP)	Rabbit	1:1000

Tabla IV-16: Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de co-inmunoprecipitación.

Mediante esta técnica, también se determinó el grado de acetilación de PGC1 α en posición Lys (lisina). Para ello, se siguió el protocolo descrito anteriormente, aislando esta vez a la proteína PGC1 α por inmunoprecipitación. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida y transferidas a una membrana de PVDF (Western Blot). La incubación con el anticuerpo primario que reconoce residuos acetilados en posición lisina permitió la detección de los niveles de acetilación de Lys en esta proteína.

El anticuerpo primario utilizado para esta técnica, así como las condiciones de incubación, se detalla en la tabla IV-13; mientras que el anticuerpo secundario correspondiente fue un *anti-rabbit* detallado en la tabla IV-14.

8) CULTIVO CELULAR: Células C₂C₁₂

8.1) Condiciones de mantenimiento del cultivo celular

Las células de mioblasto de ratón C₂C₁₂ se obtuvieron de ATCC (*American Type Culture Collection*). Esta línea celular se mantuvo en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con una concentración de glucosa de 1 g/L (Invitrogen), equivalente a 5.5 mM, suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (*FBS Gold*, PAA) y un 1% de la mezcla de antibióticos penicilina (10000 unidades/ml) – estreptomina (10000 μ g/ml) (Invitrogen).

Las células se mantuvieron adheridas a flascos de 75 cm² (Nunc) con 10 ml de medio en el interior de una incubadora a 37°C y con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. El medio se renovó cada 1-2 días.

Cuando la confluencia celular llegaba al 70-80%, las células se subcultivaban en nuevos flascos de 75 cm² con una densidad de aproximadamente 5000 células/cm². Para este propósito, se descartó el medio del flascón de cultivo y se lavaron las células con 10 ml de tampón fosfato salino (PBS; Invitrogen) atemperado y se añadieron 1.5 ml de una solución de

tripsina al 0.05% (Invitrogen) sobre las mismas. A continuación, las células se incubaron a 37°C durante unos 5 minutos, tiempo tras el cual se añadieron 10 ml de medio de mantenimiento para neutralizar la acción de la tripsina. La suspensión celular restante se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, descartando el sobrenadante. El *pellet* resultante se resuspendió con 3 ml de medio de mantenimiento nuevo y se realizó el recuento de las células en una cámara de Neubauer. De esta manera, se tomó el volumen necesario para la siembra en nuevos flascos de mantenimiento, o bien en placas de cultivo para su posterior tratamiento.

8.2) Congelación

Para la congelación de las células, se tomó una alícuota de la suspensión celular obtenida después del tratamiento con tripsina y se añadió dimetilsulfóxido (DMSO, Scharlau) a una concentración final del 10%. Después, se transfirió 1 ml de esta nueva suspensión en cada vial de congelación (Corning) y las células se almacenaron en un contenedor de congelación (Nalgene) durante 2-3 días. De esta manera, éstas se encontraban envueltas en un baño de isopropanol al 100%, que permitió que la temperatura disminuyese de forma gradual (1°C por minuto). Después de esos 2-3 días en el baño de isopropanol, las células se transfirieron para su conservación definitiva en nitrógeno líquido (-196°C).

8.3) Descongelación

Para la descongelación de una nueva alícuota de células, se extrajo el vial almacenado en nitrógeno líquido y se calentó a 37°C hasta su total descongelación. Se tomó todo el contenido del vial (1 ml) y se llevó hasta 10 ml con medio de mantenimiento. Seguidamente, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y el *pellet* resultante se resuspendió en 10 ml de medio de mantenimiento, volumen necesario para la siembra de un flascón de 75 cm².

8.4) Diferenciación

Previamente al tratamiento, fue necesario que las células de mioblastos C₂C₁₂ se diferenciases en miocitos, adoptando así una fisiología y unas características típicas de células de tejido muscular esquelético.

Para ello, una vez que las células sembradas en placas de cultivo alcanzaron un nivel de confluencia del 90-100%, se realizó un cambio en el medio celular. Se sustituyó el anterior medio de mantenimiento por un medio de diferenciación, consistente en medio DMEM, suplementado con un 2% (v/v) de suero de caballo (*Horse Serum*, Invitrogen) y con un 1% de la mezcla de antibióticos penicilina (10000 unidades/ml) – estreptomycin (10000 µg/ml). Antes de

la adición del medio de tratamiento, se realizó un lavado de las placas de cultivo con PBS atemperado.

El medio de diferenciación se renovó cada 1-2 días, hasta el momento en el cual las células adquieren la típica morfología de una célula muscular madura; es decir, una morfología fusiforme con células multinucleadas. Llegado este momento, se procedió al tratamiento de las mismas.

8.5) Tratamiento

8.5.1) Tratamiento con fructosa 25 mM 48 horas

Las células sembradas en placas de 6 pozos (Thermo Scientific), a razón de 5000 células/cm², se destinaron a la obtención de RNA y fueron incubadas con medio de tratamiento (medio DMEM, suplementado con un 1% de la mezcla de antibióticos penicilina – estreptomina) para el grupo control o con el mismo medio pero suplementado con una cantidad de fructosa (Sigma-Aldrich), previamente filtrada mediante un filtro con poros de 22 µm de diámetro y suficiente como para encontrarse a una concentración final de 25 mM en el medio. El tiempo de incubación fue de 48 horas, tiempo tras el cual se procedió a la extracción de RNA, tal y como se explica más adelante (apartado 8.6.1).

Las células sembradas en placas de 10 cm de diámetro (Corning), a razón de 5000 células/cm², se destinaron a la obtención de extracto proteico total y fueron incubadas, al igual que las anteriores, con medio de tratamiento control o con medio de tratamiento con fructosa 25 mM. El tiempo de incubación de las mismas también fue de 48 horas; pero en este caso, 10 minutos antes de proceder a la obtención de los extractos de proteína total (tal y como se explica más adelante; apartado 8.6.2), 6 placas de cada condición fueron estimuladas durante 10 minutos con insulina (Sigma-Aldrich) a diferentes concentraciones: 1 nM, 10 nM y 100 nM.

8.5.2) Tratamiento con fructosa 25 mM 6 horas

Para este tratamiento, únicamente se utilizaron células incubadas en placas de 10 cm de diámetro. En este caso, el medio de tratamiento estaba compuesto por un medio sin glucosa (*MEM Alpha Medium*, Invitrogen) suplementado con un 1% de la mezcla de antibióticos penicilina – estreptomina. A partir de este medio, se trataron las células del grupo control, mientras que las células del grupo fructosa, fueron incubadas con este medio y una cantidad de fructosa suficiente como para encontrarse a una concentración final de 25 mM.

El tiempo de incubación en este caso fue solamente de 6 horas y, al igual que en el caso anterior, 10 minutos antes de proceder a la obtención de los extractos de proteína total, 6 placas de cada condición fueron estimuladas durante 10 minutos con insulina a 100 nM.

8.6) Obtención de muestras a partir de cultivo celular

8.6.1) Aislamiento de RNA a partir de cultivo celular

Los cultivos de células destinados a la obtención de RNA total se realizaron en placas de 6 pozos, de 3.4 cm de diámetro cada uno de ellos. Una vez llevado a cabo el tratamiento correspondiente en las células, se aspiró el medio y se realizó un lavado con PBS atemperado. Posteriormente, se recogió el contenido celular con 1 ml de reactivo TRIzol® para cada pozo, homogeneizando con la misma pipeta que se utilizó para añadir el reactivo. A partir de este paso, el procedimiento para la obtención de RNA total fue el mismo que el utilizado en el aislamiento de RNA tisular, con el cambio del volumen de agua DEPC utilizado para resuspender el *pellet* final, que en este caso fue de 30 μ l. La posterior cuantificación de RNA se realizó tal y como se explica para las muestras procedentes de tejido.

8.6.2) Aislamiento de proteína total a partir de cultivo celular

Los cultivos de células destinados a la obtención de proteína total se realizaron en placas de 10 cm de diámetro. Una vez llevado a cabo el tratamiento correspondiente en las células, se aspiró el medio y se realizó un lavado con PBS atemperado. Posteriormente, se recogió el contenido celular con 1.4 ml de PBS frío, homogeneizando con la misma pipeta que se utilizó para añadir el reactivo. Este contenido celular se centrifugó a 6000 xg durante 1 minuto a 4°C. El *pellet* resultante de esta centrifuga fue resuspendido con 50 μ l de tampón de lisis RIPA (Sigma-Aldrich) que contenía una mezcla de inhibidores (Tabla IV-17). La muestra se incubó en rotación constante durante 2 horas a 4°C; tiempo tras el cual se realizó una segunda centrifuga, esta vez a 17000 xg durante 30 minutos a 4°C. Por último, el sobrenadante resultante se transfirió a un nuevo tubo de polipropileno y la concentración de proteína del extracto se determinó siguiendo el método de Bradford, explicado anteriormente.

Reactivo	Concentración
NaF (Sigma-Aldrich)	50 mM
PMSF (Sigma-Aldrich)	1 mM
Aprotinina (Sigma-Aldrich)	2 μ g/ml
Na ₃ VO ₄ (Sigma-Aldrich)	10 mM
NAM (Sigma-Aldrich)	10 mM
TSA (Sigma-Aldrich)	1 μ M
RIPA (Sigma-Aldrich)	c.s.

Tabla IV-17. Inhibidores utilizados en la extracción de proteína a partir de células C₂C₁₂.

9) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos corresponden a la media \pm la desviación estándar de un número de muestras indicado en cada pie de figura. Las diferencias estadísticamente significativas se han calculado mediante el test de t-Student de datos no pareados (para la comparación de dos condiciones), o bien mediante un ANOVA con contraste a posteriori con el test de comparación múltiple de Bonferroni, utilizando el programa informático *GraphPad Prism*. El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

V. RESULTADOS

1) SUPLEMENTACIÓN CON UN 10% (P/V) DE FRUCTOSA EN EL AGUA DE BEBIDA DE LA DIETA DE RATA SPRAGUE-DAWLEY HEMBRA DURANTE 56 DÍAS. DATOS ZOOMÉTRICOS Y ANALÍTICA PLASMÁTICA.

1.1) El consumo de fructosa provoca un incremento de la ingesta energética, aumentando el peso de los animales

Las ratas a las cuales se les suplementó la dieta con fructosa consumieron casi 5 veces más bebida (figura V-1A) y un 42% menos de pienso (figura V-1B) que las ratas control. Teniendo en cuenta que la solución de fructosa al 10% y la dieta sólida aportan 0.4 Kcal/ml y 2.9 Kcal/g, respectivamente, los animales que siguieron la dieta suplementada con fructosa consumieron 1.6 veces más calorías que los animales control (figura V-1C), por lo que la reducción de la ingesta de pienso no fue suficiente como para compensar el gran aporte energético proveniente de la fructosa.

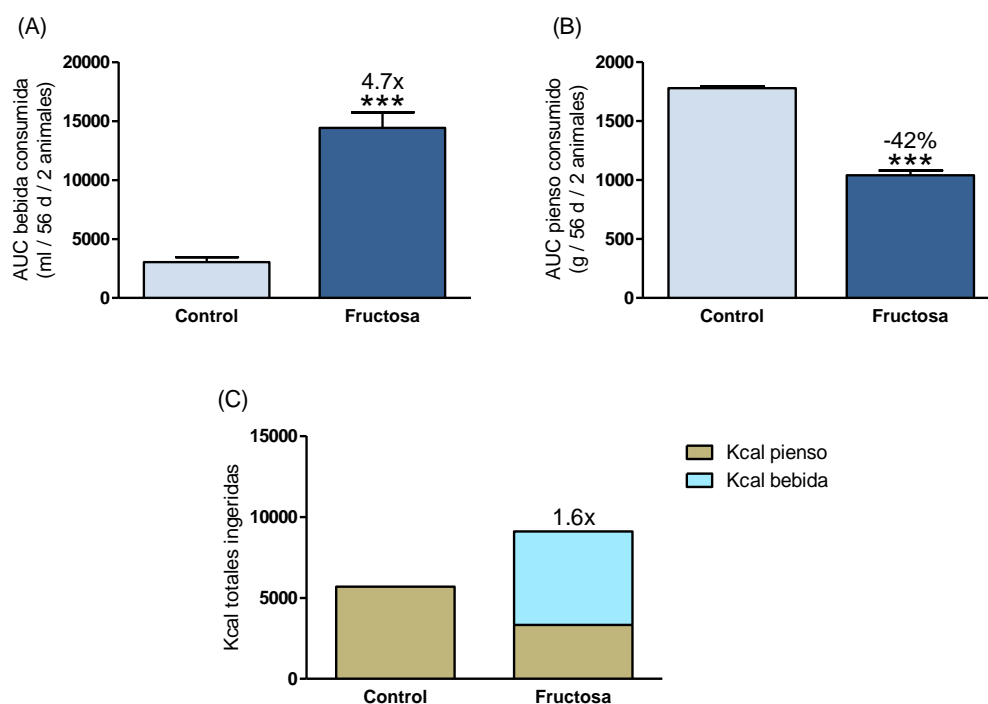


Figura V-1. Área bajo la curva (AUC) de la bebida (A) y del pienso (B) consumido por las ratas los 56 días del estudio, así como valores de consumo calórico total expresado en Kcal totales (C). Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=4$ jaulas para las ratas del grupo control y $n=5$ jaulas para las ratas del grupo fructosa. *** $p<0.001$ vs Control.

Este incremento en la ingesta calórica total de las ratas fructosa fue acompañado de un aumento en la evolución del peso corporal a lo largo del estudio, expresado como AUC (figura V-2A) del mismo. La suplementación con fructosa también indujo un peso mayor de los animales tras 56 días (figura-V2B), así como un incremento en las relaciones peso del hígado con respecto al peso corporal (figura V-2C) y peso del tejido adiposo visceral (TAV) con respecto al peso corporal (figura V-2D).

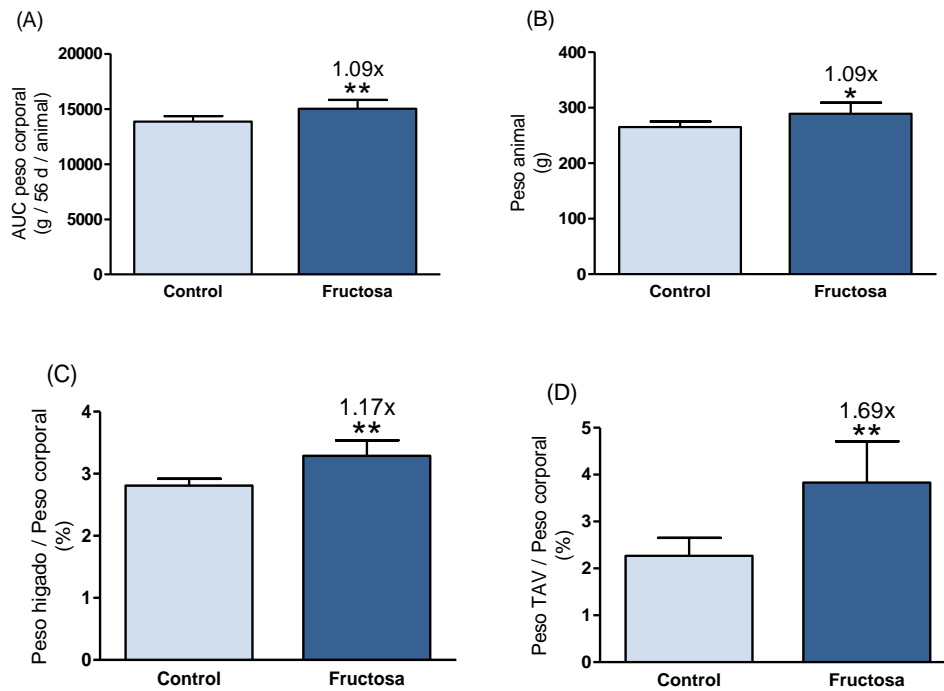


Figura V-2. Área bajo la curva (AUC) de la evolución del peso corporal a lo largo de todo el estudio (A), peso corporal el día del sacrificio (B), así como relación peso hígado / peso corporal (C) y peso tejido adiposo visceral/ peso corporal (D) de las ratas tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. *p<0.05 y **p<0.01 vs Control.

1.2) El consumo de fructosa induce hipertrigliceridemia y uricemia; así como un incremento en los niveles plasmáticos de insulina y leptina

A la hora de determinar algunos parámetros plasmáticos de interés, se observó cómo la suplementación con fructosa era capaz de inducir un aumento del 69% en plasma de los niveles de triglicéridos y de un 87% de los de ácido úrico (figuras V-3A y V-3B) en comparación con el grupo control. Por su parte, las concentraciones de glucosa y colesterol no se vieron alteradas por el consumo de este azúcar (figuras V-4A y V-4B).

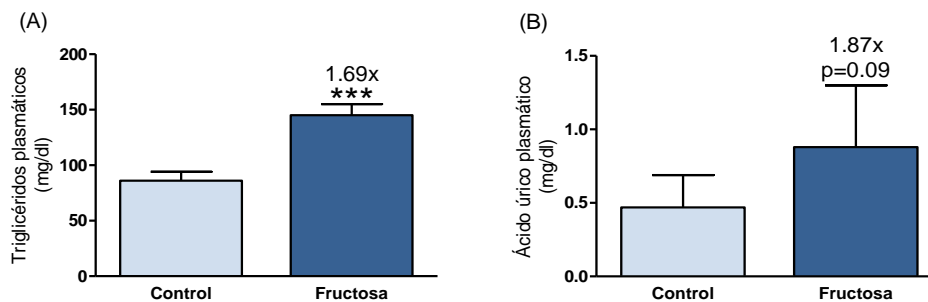


Figura V-3. Niveles plasmáticos de triglicéridos (A) y ácido úrico (B) tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. ***p<0.001 vs Control.

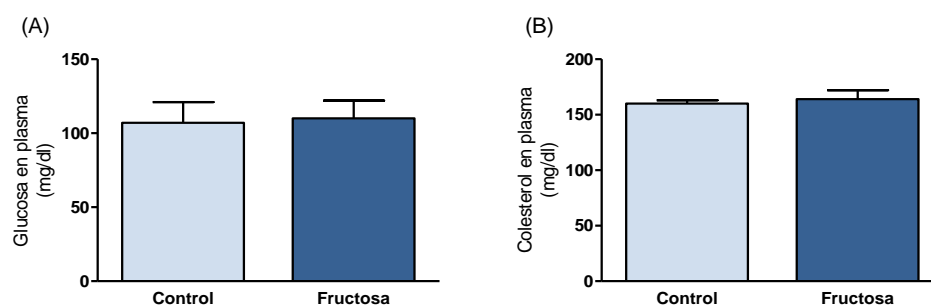


Figura V-4. Niveles plasmáticos de glucosa (A) y colesterol (B) tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

Se estudiaron los niveles de determinadas hormonas circulantes en plasma y se observó cómo una ingesta de fructosa provocaba hiperinsulinemia e hiperleptinemia (figuras V-5A y V-5B, respectivamente) con respecto a las ratas del grupo control, mientras que los niveles de adiponectina y FGF21 no se vieron alterados (figuras V-5C y V-5D, respectivamente).

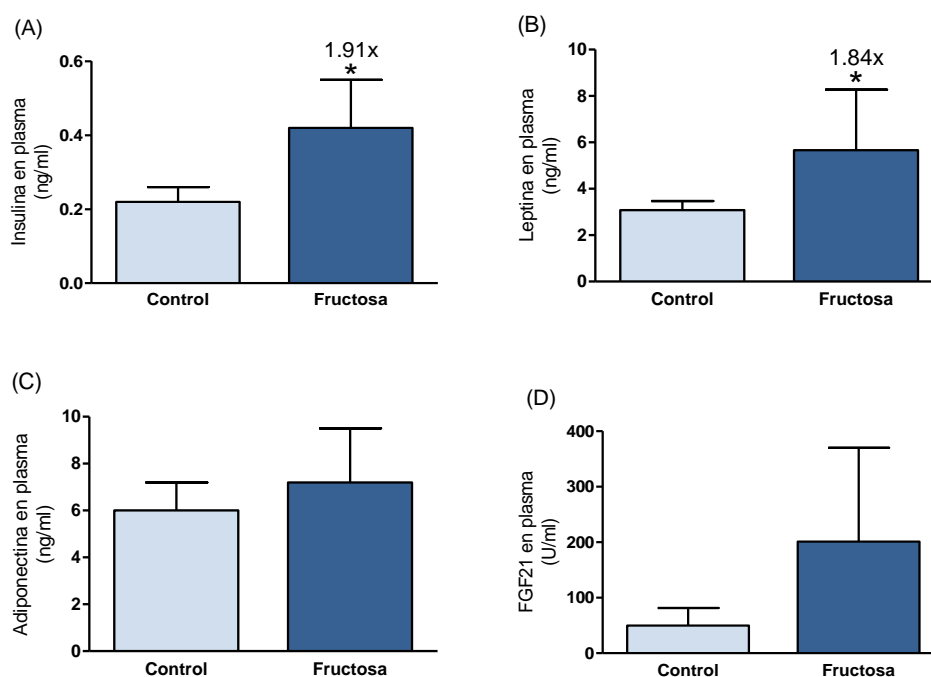


Figura V-5. Niveles plasmáticos de insulina (A), leptina (B), adiponectina (C) y FGF21 (D) tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. * $p<0.05$ vs Control.

2) EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON UN 10% (P/V) DE FRUCTOSA EN EL AGUA DE BEBIDA DE LA DIETA DE RATA SPRAGUE-DAWLEY HEMBRA DURANTE 56 DÍAS SOBRE EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS.

2.1) Efectos sobre el hígado

2.1.1) El consumo de fructosa induce su propio metabolismo

Tal y como se ha descrito anteriormente, la fructocinasa (FK) es el primer enzima que metaboliza la fructosa una vez que ésta es captada por el hepatocito y su expresión aumenta con el consumo de fructosa (Ouyang y col., 2008). Cuando se determinaron los niveles de esta proteína se observó que las ratas que habían consumido fructosa presentaban casi 2 veces más FK hepática que las ratas del grupo control (figura V-6).

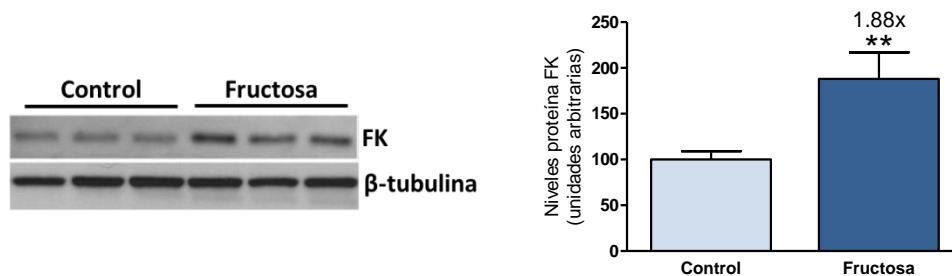


Figura V-6. Niveles de la proteína FK determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. ** $p < 0.01$ vs Control.

Se analizaron también los niveles de la proteína glucocinasa (GK), proteína reguladora de la entrada de glucosa en la vía glucolítica en el hígado, sin encontrar cambios significativos al comparar la expresión de esta proteína entre los dos grupos de estudio (figura V-7).

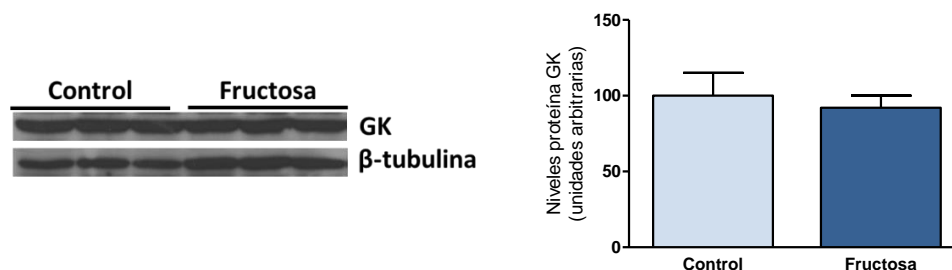


Figura V-7. Niveles de la proteína GK determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de proteína β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

2.1.2) El consumo de fructosa causa esteatosis hepática, aumentando el contenido de triglicéridos en este tejido

De forma similar a estudios previos (Roglans y col., 2007; Vilà y col., 2011; Rebollo y col., 2014b), la ingesta de fructosa líquida durante 56 días produjo un aumento del contenido de triglicéridos hepáticos (figura V-8A). Al analizar la composición en ácidos grasos de los triglicéridos hepáticos, se observó cómo la suplementación con fructosa líquida provocó un descenso a la mitad en los niveles de ácido araquidónico (AA) (figura V-8B). Además, las ratas que habían ingerido fructosa presentaron un aumento en el porcentaje de ácidos grasos saturados (SFAs) (figura V-8C). Por último, en estos animales se observó también un aumento de casi 3 veces en la cantidad ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y una disminución del 48% en los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (figura V-8D) en hígado, en comparación con las ratas control.

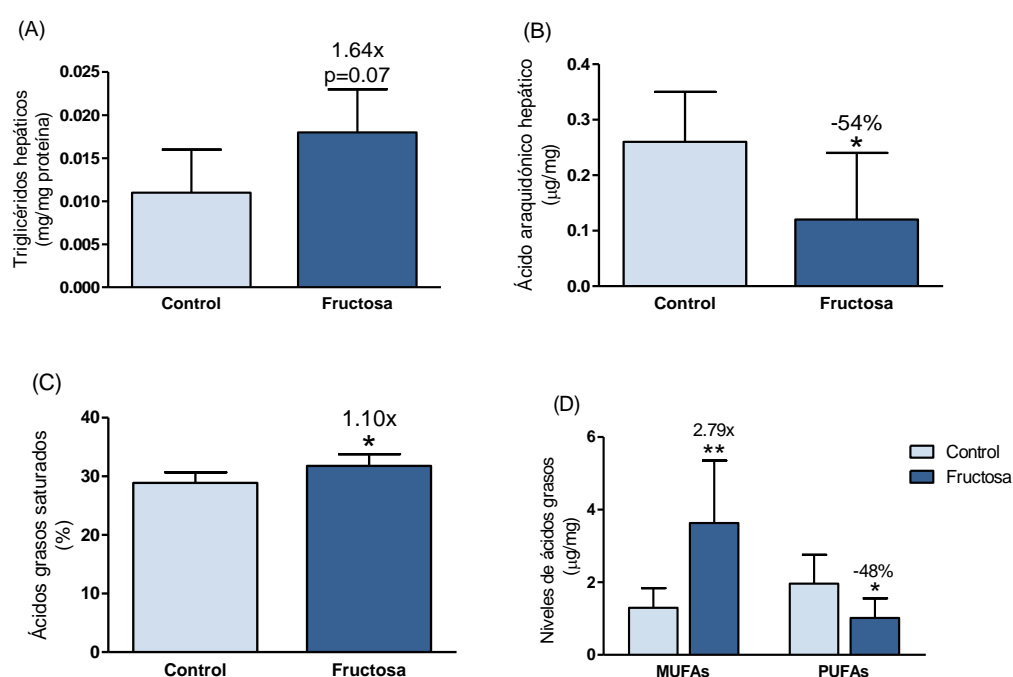


Figura V-8. Niveles de triglicéridos hepáticos (A), ácido araquidónico (B), ácidos grasos saturados (SFAs) (C) y ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) o poliinsaturados (PUFAs) (D) determinados en muestras hepáticas de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. * $p<0.05$ ** $p<0.001$ vs Control.

Se analizaron en detalle los ácidos grasos específicos que formaban parte de la fracción “grasa” del hígado, observándose un incremento significativo en la cantidad de ácido palmítico (4.1 veces) y de ácido oleico (2.7 veces) en ratas suplementadas con fructosa, en comparación con ratas del grupo control. Sin embargo, la cantidad de ácido palmítico y de ácido esteárico presentó una tendencia a incrementar en hígado de ratas fructosa, pero sin llegar a hacerlo de manera significativa. De esta manera, la actividad del enzima esteroil coenzima A desaturasa 1

(SCD1), calculada mediante el ratio ácido palmitoleico/ácido palmítico, se encontró incrementada de manera significativa en aquellas ratas que habían ingerido fructosa líquida (figura V-9).

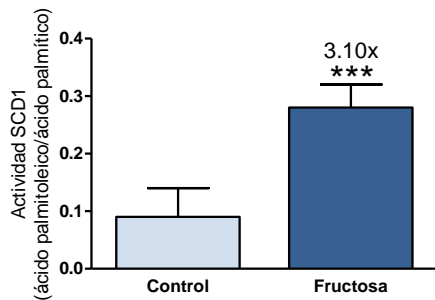


Figura V-9. Actividad del enzima SCD1 en hígado de ratas suplementadas 56 días con fructosa líquida. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. *** $p < 0.001$ vs Control.

Este aumento en la cantidad de triglicéridos en el hígado de ratas suplementadas con fructosa resultó en una esteatosis hepática, tal y como confirmaron los análisis histológicos de tinción con Oil Red O (figura V-10).

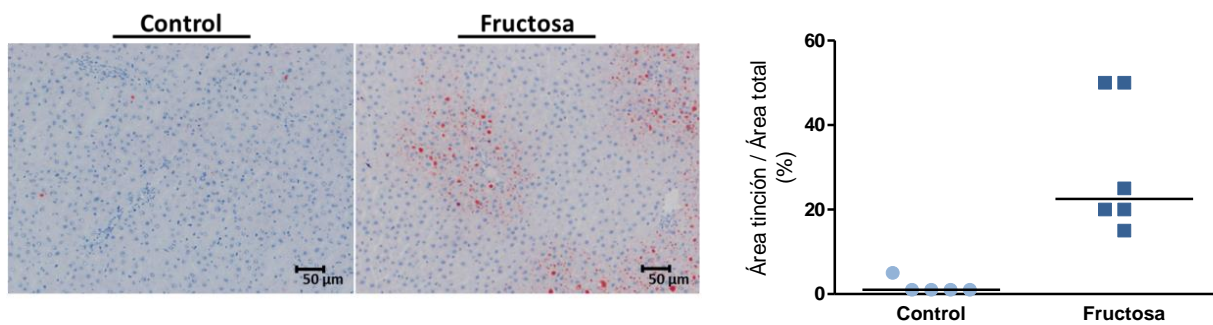


Figura V-10. Esteatosis hepática en ratas suplementadas 56 días con fructosa líquida. Las imágenes son representativas de secciones de hígado de ratas control ($n=5$) y de ratas fructosa ($n=6$). A la derecha, gráfico de dispersión que muestra los valores individuales de cada área teñida con Oil Red O, calculada como el porcentaje del área teñida con respecto al área total. La línea horizontal indica la mediana de cada grupo.

En trabajos anteriores, nuestro grupo de investigación ya demostró que la aparición de hipertrigliceridemia y esteatosis hepática como consecuencia de la ingesta de fructosa en forma líquida durante 14 días tiene lugar cuando, de manera simultánea, se produce un incremento de la síntesis de lípidos y una reducción del catabolismo de ácidos grasos (Roglans y col., 2002; Roglans y col., 2007). Así, se procedió al análisis de la expresión de enzimas hepáticos implicados en ambos procesos.

2.1.3) El consumo de fructosa aumenta la expresión de los genes implicados en la lipogénesis hepática

Entre los enzimas que participan en la síntesis de ácidos grasos en el hígado se encuentran GAPDH, LPK, FAS, GPAT y SCD1. En el presente estudio, se observó cómo una suplementación con fructosa líquida durante 56 días inducía la expresión génica de estos genes (figura V-11).

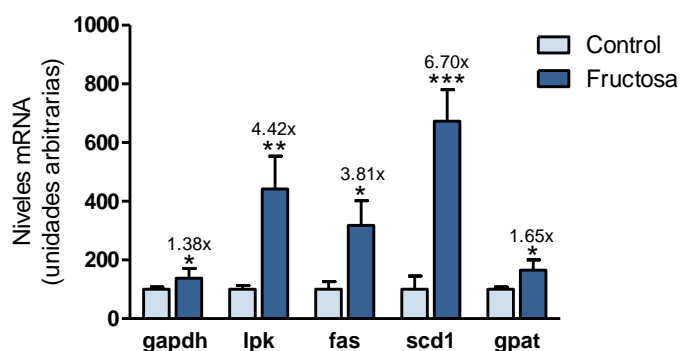


Figura V-11. Niveles de expresión de genes que participan en la síntesis de ácidos grasos en hígado determinados en muestras hepáticas de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de *gapdh*. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$ vs Control.

El incremento en la expresión génica de *scd1* en ratas fructosa concuerda con los resultados de la actividad hepática de este enzima, previamente descritos.

También se determinaron los niveles de expresión de ACC, otra proteína muy importante en la vía de la lipogénesis hepática, mediante la técnica de Western Blot. De esta manera, se observó cómo la ingesta de fructosa líquida producía tanto un aumento en la expresión total de la proteína ACC como un aumento en su forma fosforilada en el residuo serina⁷⁹. De esta manera, el grado de activación de esta proteína, determinado por el ratio de proteína fosforilada con respecto a la proteína total, no se modificó en las ratas del grupo fructosa (figura V-12).

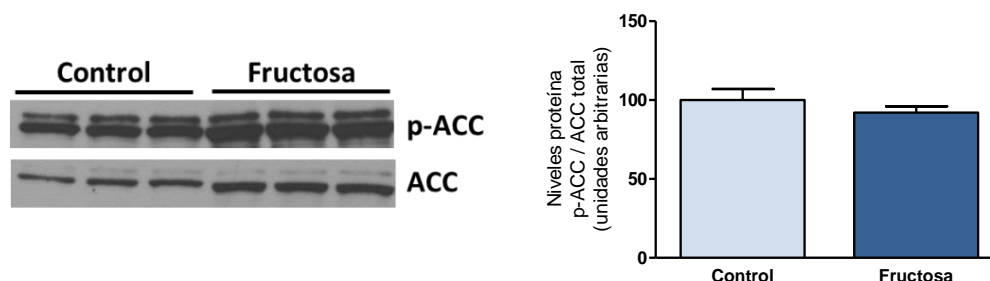


Figura V-12. Relación de la proteína ACC fosforilada en Ser⁷⁹ con respecto a ACC total determinada en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. La uniformidad de carga se comprobó por tinción de las membranas con Roig Ponceau. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Se analizó también el grado de activación por fosforilación en Thr¹⁷² de la cinasa AMPK α , que regula la actividad de la proteína ACC. Se observó cómo la suplementación con fructosa líquida no inducía ningún tipo de efecto sobre la activación o la expresión de esta cinasa (figura V-13).

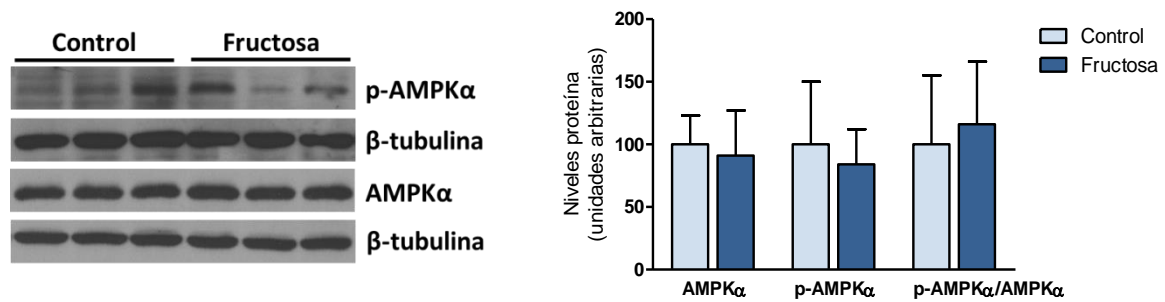


Figura V-13. Niveles de la proteína AMPK α , tanto en su forma fosforilada en residuo Thr¹⁷² como en su forma total, así como la relación AMPK α fosforilada con respecto a AMPK α total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. Tanto la forma fosforilada como la forma total se normalizaron con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Las proteínas GAPDH, LPK, FAS, SCD1, GPAT y ACC son marcadores de actividad lipogénica en hígado y son regulados por los factores de transcripción ChREBP y SREBP-1c, por lo que posteriormente se analizaron los niveles proteicos de estas dos proteínas responsables de la lipogénesis hepática en respuesta a las condiciones nutricionales. De esta manera, se observó cómo una suplementación con fructosa líquida era capaz de inducir un aumento de hasta 6 veces en la expresión de ChREBP, pero no así de la forma madura de SREBP-1c (figura V-14).

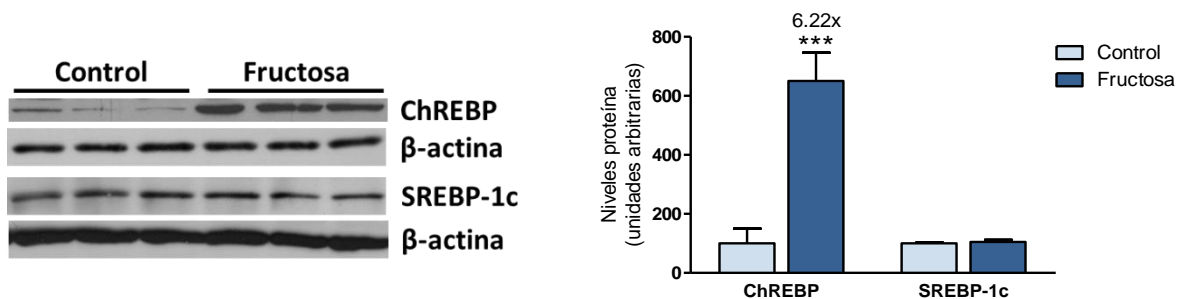


Figura V-14. Niveles de la proteínas ChREBP y SREBP-1c determinados en muestras hepáticas de extracto nuclear de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -actina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. ***p<0.001 vs Control.

Este aumento en la lipogénesis hepática en ratas fructosa tuvo como consecuencia una mayor liberación de triglicéridos en plasma, provocando hipertrigliceridemia en estos animales, tal y como ya se ha mencionado en el apartado 1.2. Además, la cromatografía FPLC demostró que esta hipertrigliceridemia después de una suplementación con fructosa era debida al aumento de partículas VLDL (figura V-15).

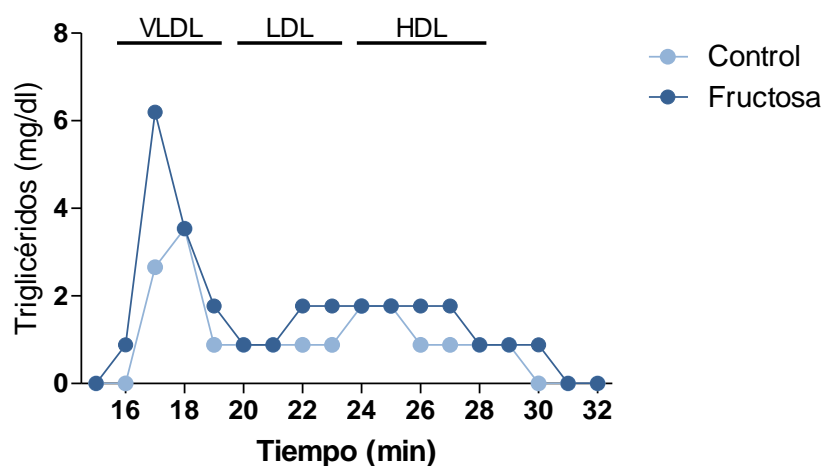


Figura V-15. Concentraciones de triglicéridos en plasma de las fracciones obtenidas en la cromatografía FPLC. Los resultados se expresan como un pool de 6 muestras para el grupo control y un pool de 8 muestras para el grupo fructosa.

Gracias a la cromatografía FPLC también se pudo observar cómo no había diferencias entre los niveles de colesterol correspondientes a las lipoproteínas LDL y HDL entre el grupo fructosa y el grupo control (figura V-16).

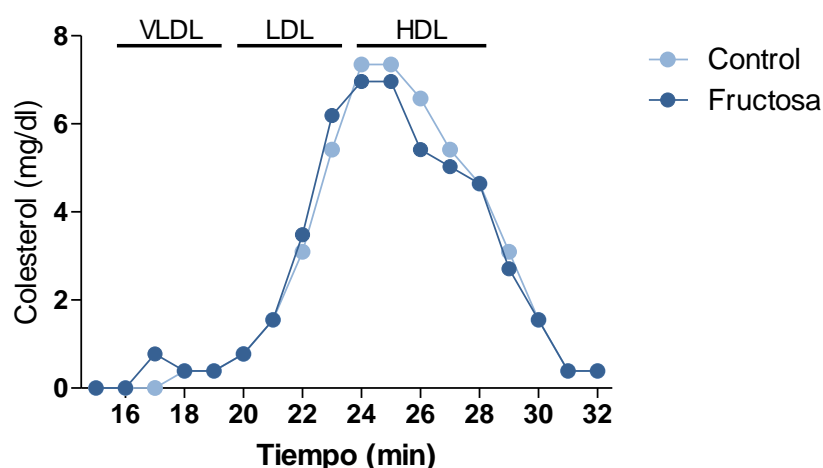


Figura V-16. Concentraciones de colesterol en plasma de las fracciones obtenidas en la cromatografía FPLC. Los resultados se expresan como un pool de 6 muestras para el grupo control y un pool de 8 muestras para el grupo fructosa.

Se analizaron, mediante la técnica de PCR a tiempo real, los niveles de expresión de los genes que codifican para las proteínas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*g6pdh*) y lactato deshidrogenasa (*ldh*), que están estrechamente relacionadas con la vía de la glucólisis. De esta forma, se determinó cómo una suplementación con fructosa líquida provocaba un aumento significativo en la expresión de ambos genes (figura V-17).

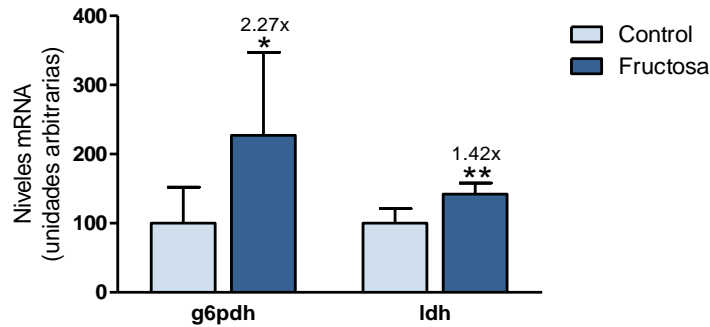


Figura V-17. Niveles de expresión de los genes *g6pdh* y *ldh* determinados en muestras hepáticas de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de *tbp*. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. * $p<0.05$ y ** $p<0.01$ vs Control.

2.1.4) El consumo de fructosa disminuye la actividad de β -oxidación de ácidos grasos en hígado, sin modificar los niveles de PPAR α y genes asociados

Con respecto al catabolismo lipídico, se determinó la actividad de β -oxidación de los ácidos grasos a nivel hepático y se observó una ligera reducción del 23% en aquellas ratas que habían consumido fructosa durante 56 días (figura V-18).

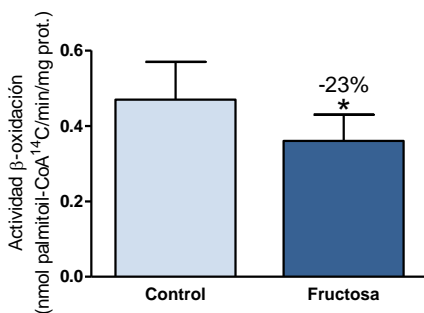


Figura V-18. Actividad de β -oxidación de los ácidos grasos determinada en muestras de sobrenadante postnuclear de hígado de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. * $p<0.05$ vs Control.

A pesar de esta disminución en la β -oxidación hepática en ratas fructosa, a diferencia de lo observado en estudios previos en nuestro laboratorio (Rebollo y col., 2014b), los niveles de expresión del gen *ppara* para estas ratas no se vieron modificados, así como tampoco sus genes diana *l-cpt1 α* (*liver-cpt1 α*) y *aco* (figura V-19A). También se determinó la expresión de genes relacionados con PPAR α , como *pgc1 α* y *hnf4*; y se observó cómo la suplementación con fructosa inducía un ligero aumento en la expresión de *pgc1 α* y una leve disminución de *hnf4* (figura V-19B).

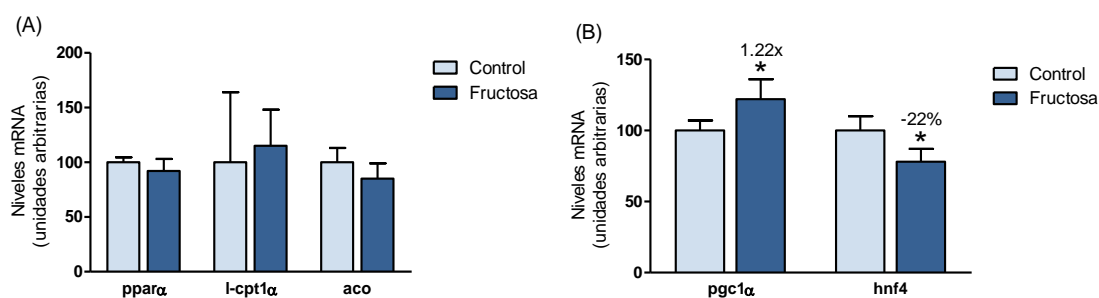


Figura V-19. Niveles de expresión de los genes *ppar α* , *l-cpt1 α* y *aco* (A), y *pgc1 α* y *hnf4* (B) determinados en muestras hepáticas de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de *tbp*. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. * $p<0.05$ vs Control.

Mediante la técnica de Western Blot, se observó cómo las pequeñas variaciones en la expresión de los genes *pgc1 α* y *hnf4* en las ratas fructosa desaparecían cuando se analizaban los niveles de la proteína (figura V-20A). En el caso de la proteína PGC1 α , se determinó también mediante la técnica de la co-inmunoprecipitación el nivel de acetilación, observándose cómo la suplementación con fructosa no inducía ningún cambio en este aspecto (figura V-20B). Por último, también se analizaron los niveles de la proteína PPAR α y, a pesar de que el RNA mensajero no presentase cambios en su expresión tras la ingesta con fructosa, gracias a la técnica de Western Blot se observó un ligero aumento del 22% en los niveles de proteína de este factor de transcripción (figura V-21).

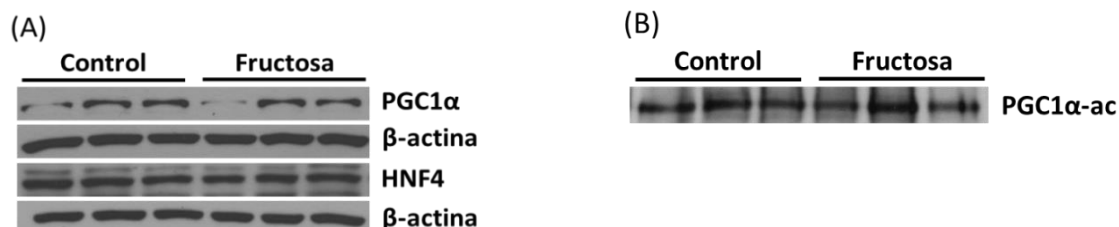


Figura V-20. Imágenes representativas del ensayo de Western Blot para la detección de los niveles de PGC1 α y HNF4 (A) y de PGC1 α -acetilado (B) en muestras de extracto nuclear de hígado de rata tras 56 días de estudio.

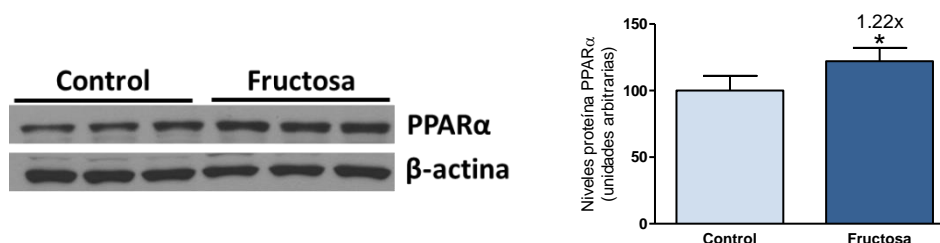


Figura V-21. Niveles de la proteína PPAR α determinados en muestras hepáticas de extracto nuclear de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -actina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. * $p<0.05$ vs Control.

Estudios previos en nuestro laboratorio habían demostrado cómo un descenso en la actividad PPAR α en hígado de ratas suplementadas 14 días con fructosa podía ser debido a una disminución de la actividad desacetilasa de Sirt1, que se caracterizaba por un descenso en los niveles de las proteínas Sirt1 y NAMPT, fenómeno que conducía a un estado de hiperacetilación e inactivación de PGC1 α (Rebollo y col., 2014b). Por este motivo, se decidió analizar los niveles de estas dos proteínas en ratas suplementadas 56 días con fructosa y se observó cómo los niveles totales de Sirt1 se encontraban disminuidos en el hígado de las ratas fructosa (figura V-22). Sin embargo, en el presente trabajo los niveles de expresión de la proteína NAMPT fueron inducidos como resultado de una ingesta de fructosa líquida (figura V-23).

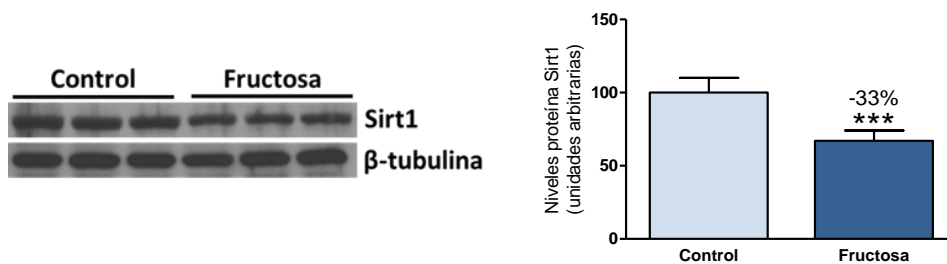


Figura V-22. Niveles de la proteína Sirt1 determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. *** $p<0.001$ vs Control.

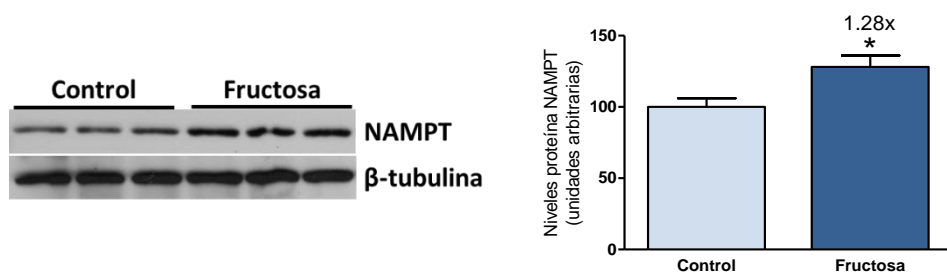


Figura V-23. Niveles de la proteína NAMPT determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. * $p<0.05$ vs Control.

Estos datos pueden interpretarse como un mecanismo compensador del organismo frente a un descenso de los niveles de Sirt1, de tal manera que la actividad de esta desacetilasa no se vería modificada, tal y como confirma la acetilación de PGC1 α mostrada en la figura V-20B.

2.2) Efectos sobre el tejido muscular esquelético

Mediante la técnica de PCR a tiempo real se analizaron los niveles de los genes que codifican para las proteínas GLUT4 y GLUT5, transportadores de glucosa y fructosa, respectivamente, en el tejido muscular esquelético. Se observó cómo la suplementación con fructosa inducía una ligera disminución de los niveles de *glut4*; mientras que los niveles de *glut5* no se vieron modificados (figura V-24).

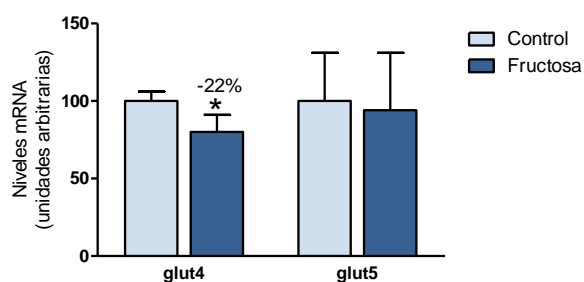


Figura V-24. Niveles de expresión de los genes *glut4* y *glut5* determinados en muestras de tejido muscular esquelético de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de *apt*. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. * $p<0.05$ vs Control.

Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de genes implicados en el metabolismo de carbohidratos y lípidos en el tejido muscular. De esta manera, se observó cómo una ingesta de fructosa durante 56 días disminuía los niveles de expresión de los genes *ppar α* , *ppar β/δ* y *pgc1 α* (figura V-25), en comparación con las ratas control.

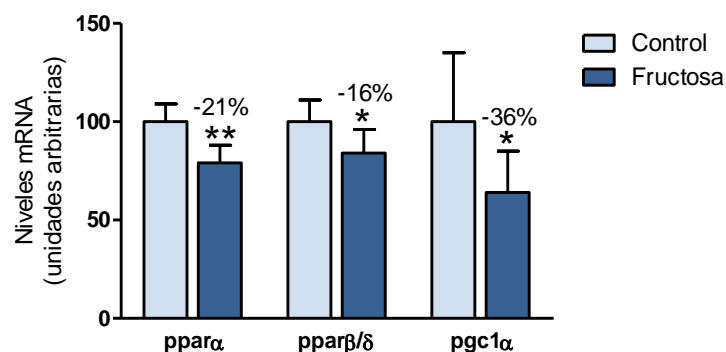


Figura V-25. Niveles de expresión de los genes *ppar α* , *ppar β/δ* y *pgc1 α* determinados en muestras de tejido muscular esquelético de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de *apt*. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. * $p<0.05$ y ** $p<0.01$ vs Control.

Con el objetivo de determinar si estas variaciones en los niveles de los genes de *ppar α* y *ppar β/δ* tenían su continuidad a nivel proteico, se realizó la técnica de Western Blot, gracias a la cual se observó que los niveles de proteína de ambos factores de transcripción permanecían inalterados tras la suplementación con fructosa líquida (figura V-26).

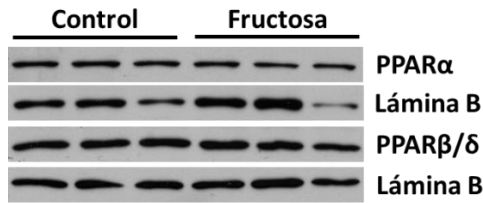


Figura V-26. Imágenes representativas del ensayo de Western Blot para la detección de los niveles de PPARα y PPARβ/δ en muestras de extracto nuclear de tejido muscular esquelético de rata tras 56 días de estudio.

Los niveles proteicos de PPARα no alterados en el músculo de ratas fructosa, fueron confirmados con el análisis de la expresión de los genes *cpt1b* y *pdk4*, dianas para este factor de transcripción en el tejido muscular y que no presentaban cambios en sus niveles con respecto a las ratas del grupo control (figura V-27).

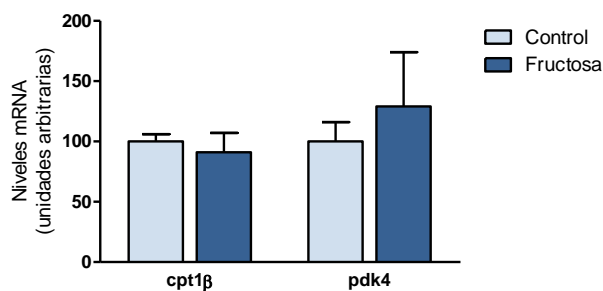


Figura V-27. Niveles de expresión de los genes *cpt1b* y *pdk4* determinados en muestras de tejido muscular de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de *apt*. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

Se estudiaron los niveles del enzima fructocinasa (FK) en el tejido muscular esquelético, para comprobar si, al igual que ocurría en el hígado, la fructosa era capaz de inducir su propio metabolismo. Se observó que la suplementación con fructosa líquida no provocaba cambios en los niveles de la proteína fructocinasa en el tejido muscular esquelético (figura V-28).

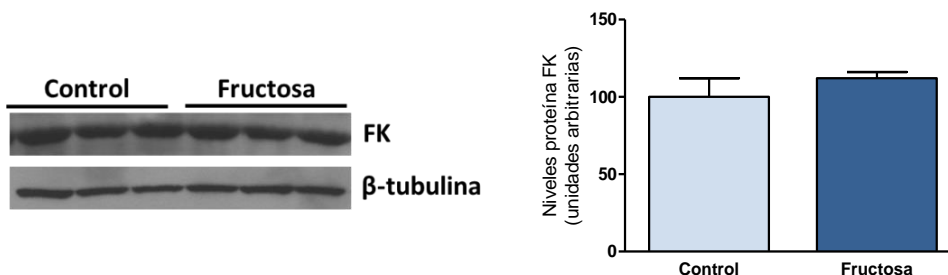


Figura V-28. Niveles de la proteína FK determinados en muestras de tejido muscular esquelético de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de proteína β-tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Posteriormente, se analizaron los niveles del gen que codifica para la proteína GPR119 (implicada en la regulación negativa de oxidación de lípidos en el tejido muscular), así como los niveles de la proteína total en muestras de tejido muscular de ratas tras 56 días de estudio. De esta forma, se observó que la ingesta de fructosa líquida inducía un aumento en los niveles de expresión de GPR119, tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico (figura V-29A y figura V-29B, respectivamente).

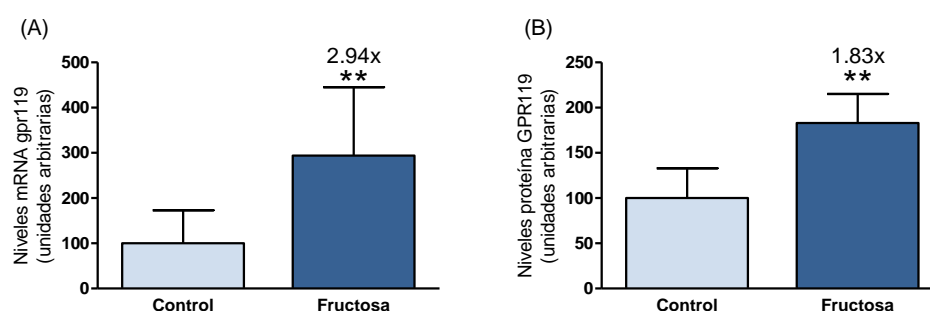


Figura V-29. Niveles de expresión del gen *gpr119* normalizados con los niveles de *apt* (A) y niveles de la proteína GPR119 normalizados con los niveles de β -tubulina (B) en muestras de tejido muscular esquelético de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. ** $p < 0.01$ vs Control.

2.3) Efectos sobre el tejido adiposo

Debido a la hiperleptinemia observada en ratas suplementadas con fructosa líquida, se analizó los niveles de expresión del gen que codifica para la leptina en estos animales. Se observó cómo una ingesta de fructosa induce un aumento en la expresión del gen *ob*, en comparación con las ratas control (figura V-30).

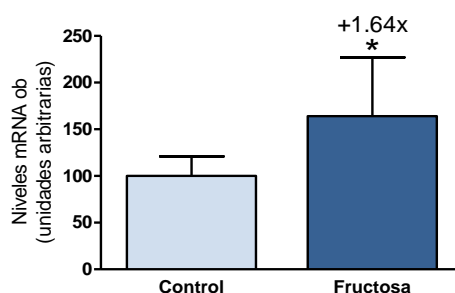


Figura V-30. Niveles de expresión del gen *ob* normalizados con los niveles de *18s* en muestras de tejido adiposo de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. * $p < 0.05$ vs Control.

3) EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON UN 10% (P/V) DE FRUCTOSA EN EL AGUA DE BEBIDA DE LA DIETA DE RATA SPRAGUE-DAWLEY HEMBRA DURANTE 56 DÍAS SOBRE LA VÍA DEL ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO, INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO

3.1) El consumo de fructosa causa una activación “atípica” de la vía del estrés de retículo

Mediante la técnica de Western Blot se analizó el posible efecto que una suplementación con fructosa líquida podía tener sobre la vía del estrés de retículo endoplasmático. Se analizaron las tres ramas de la respuesta UPR y se observó cómo una ingesta de fructosa era capaz de activar por fosforilación a la proteína IRE1 (figura V-31) y de disminuir ligeramente los niveles de PERK total, mientras que la forma fosforilada de esta proteína no se modificó (figura V-32). Los niveles de la proteína ATF6 α no sufrieron ningún tipo de alteración tras una ingesta de fructosa (figura V-33).

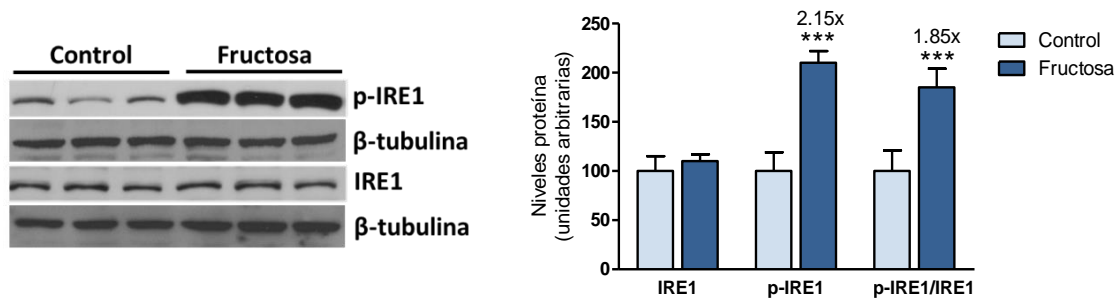


Figura V-31. Niveles de la proteína IRE1, tanto en su forma fosforilada en residuo Ser⁷²⁴ como en su forma total, así como la relación IRE1 fosforilada con respecto a IRE1 total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. Tanto la forma fosforilada como la forma total se normalizaron con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. *** $p<0.001$ vs Control.

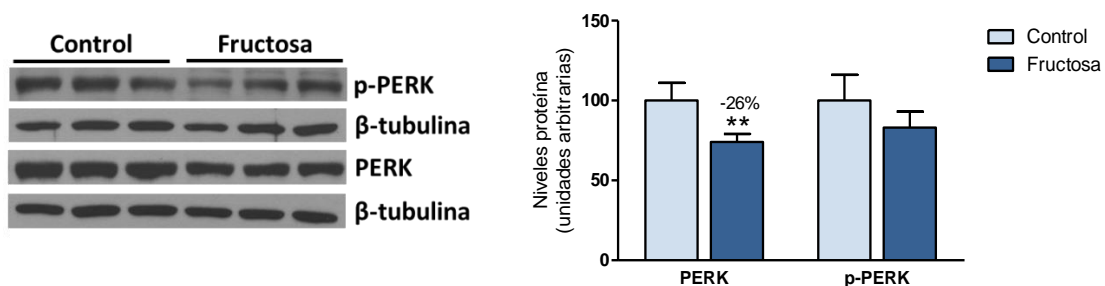


Figura V-32. Niveles de la proteína PERK, tanto en su forma fosforilada en residuo Thr⁹⁸¹ como en su forma total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. Tanto la forma fosforilada como la forma total se normalizaron con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. ** $p<0.01$ vs Control.

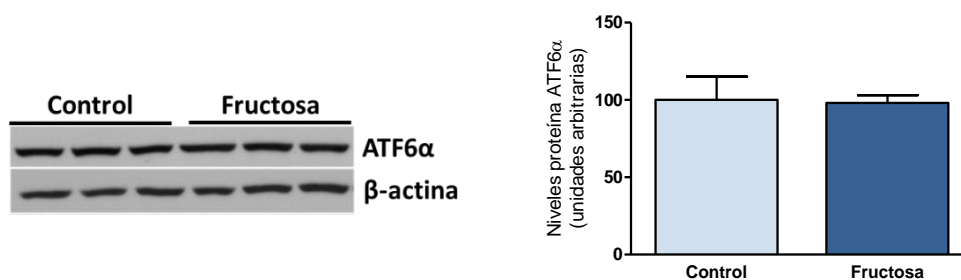


Figura V-33. Niveles de la proteína ATF6α determinados en muestras hepáticas de extracto nuclear de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β-actina. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Esta activación “atípica” de la respuesta UPR implicó que los niveles de los genes diana de los tres factores de transcripción que participan en las tres ramas de la vía del estrés de retículo no se vieran modificados en el hígado de las ratas suplementadas con fructosa líquida (figura V-34).

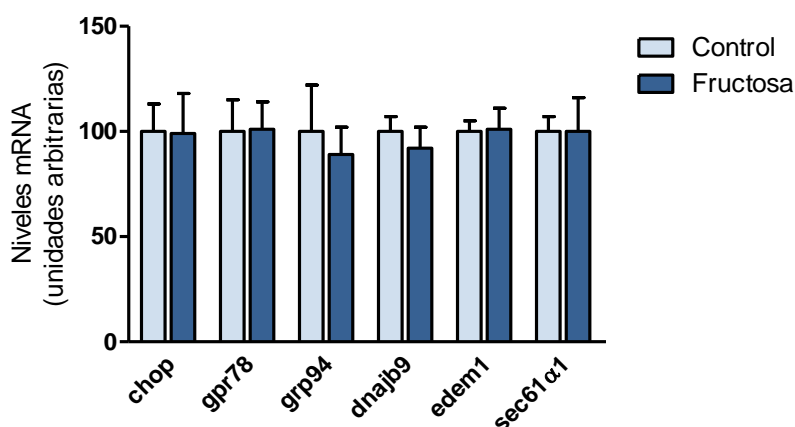


Figura V-34. Niveles de expresión de genes diana de la respuesta UPR determinados en muestras hepáticas de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de *tbp*. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa.

Ya que la rama de la respuesta UPR que se activó de una manera más clara tras una suplementación con fructosa líquida fue aquella en la que participa la proteína IRE1, se procedió al análisis de los efectos que esta activación causaba en marcadores relacionados con esta proteína y el estrés de retículo endoplasmático.

El primero de esos marcadores analizados fue el factor de transcripción XBP1. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron cómo una ingesta de fructosa durante 14 días producía un aumento en la fosforilación y en la activación de IRE1, que gracias a su actividad endoribonucleasa, provocaba un incremento en la forma *splicing* de XBP1 (Rebollo y col., 2014a). Sin embargo, en el reciente estudio se observó que la ingesta de fructosa durante 56 días no inducía un aumento en la forma *splicing* del mensajero de este factor de transcripción (figura V-35), resultado que se corroboró al analizar los niveles de proteína de XBP1s en extracto nuclear (figura V-36).

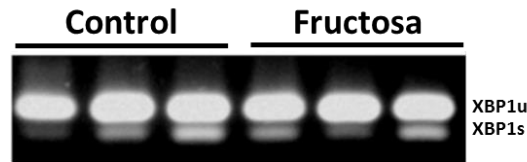


Figura V-35. Imagen representativa del ensayo de PCR del gen XBP1 detectada por tinción del gel de agarosa con bromuro de etidio. Se muestran los niveles de mRNA de las formas no procesada (XBP1u) y procesada (XBP1s) de este factor de transcripción en muestras de hígado de rata. Se hicieron pools de las muestras de RNA total de partida, con n=3 muestras procedentes del grupo control y n=4 muestras procedentes del grupo fructosa.

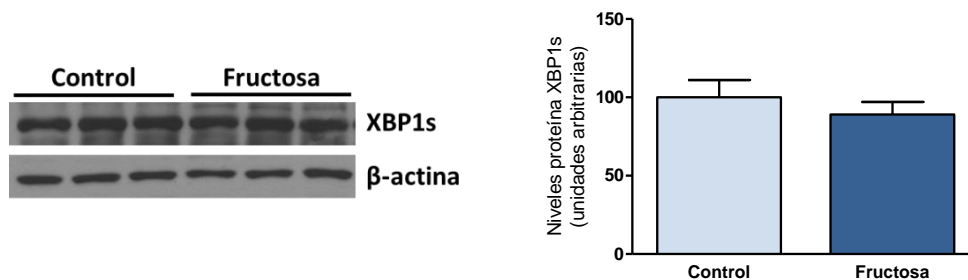


Figura V-36. Niveles de la proteína XBP1s (forma procesada) determinados en muestras hepáticas de extracto nuclear de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -actina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

La proteína IRE1, mediante su actividad endoribonucleasa, es capaz de degradar cadenas de mRNA de algunos genes, como es el caso de *IkB α* . Se determinaron los niveles de mensajero de este marcador, relacionado con la respuesta inflamatoria, y se observó cómo en ratas fructosa, que presentaban una activación muy evidente de IRE1, los niveles de *IkB α* se encontraban disminuidos un 22% (figura V-37). Sin embargo, a la hora de analizar los niveles proteicos de este marcador, se observó cómo esta disminución en el mRNA de este marcador se perdía a nivel de proteína, ya que las ratas fructosa presentaban unos niveles de proteína *IkB α* similares a las ratas control (figura V-38). Estos últimos datos se corroboraron a la hora de determinar los niveles del gen TNF α , marcador también de un proceso inflamatorio; ya que se observó como la suplementación con fructosa no inducía un aumento en los niveles de expresión de este gen (figura V-39).

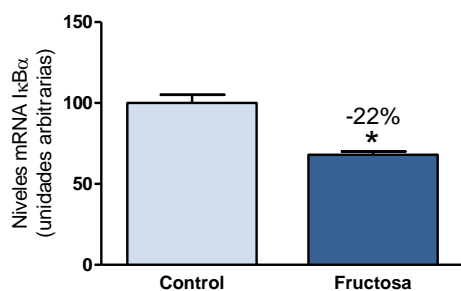


Figura V-37. Niveles de expresión del gen $\text{IkB}\alpha$ normalizados con los niveles de tbp en muestras de hígado de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. * $p<0.05$ vs Control.

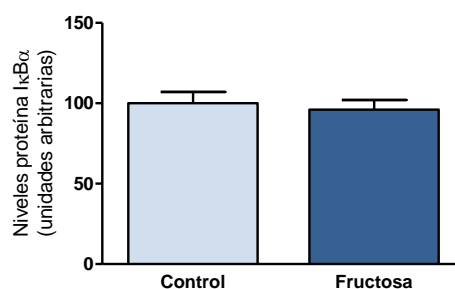
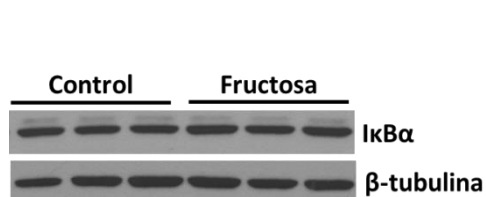


Figura V-38. Niveles de la proteína $\text{IkB}\alpha$ determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

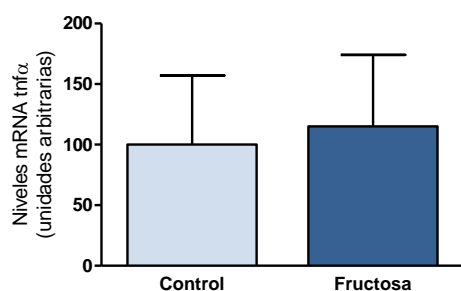


Figura V-39. Niveles de expresión del gen tnfa normalizados con los niveles de tbp en muestras de hígado de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

La proteína IRE1 activa también es capaz de actuar como cinasa, siendo JNK una proteína diana de esta actividad y cuyo aumento en la fosforilación se ha visto relacionado con fenómenos de resistencia a la insulina (Chan y col., 2013). Por este motivo, se analizaron los niveles de fosforilación de JNK y se observó cómo, a pesar de que las ratas fructosa presentan una activación muy evidente de la proteína IRE1, los niveles de fosforilación de JNK no estaban incrementados en el hígado de estos animales, sino que incluso se encontraban ligeramente disminuidos en comparación con las ratas del grupo control (figura V-40).

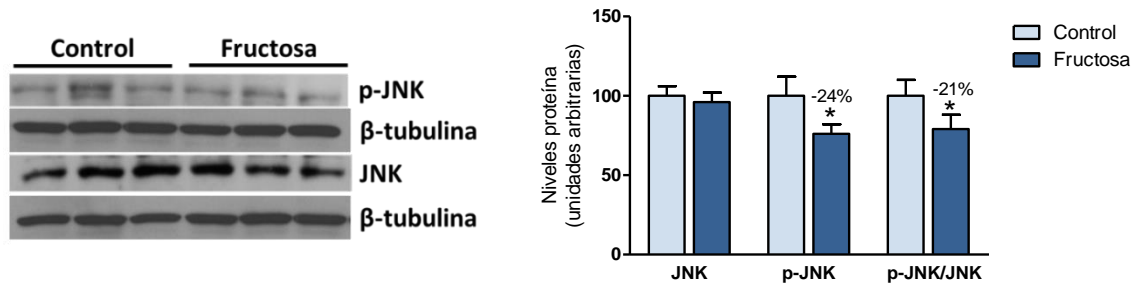


Figura V-40. Niveles de la proteína JNK, tanto en su forma fosforilada en residuo Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵ como en su forma total, así como la relación JNK fosforilada con respecto a JNK total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. Tanto la forma fosforilada como la forma total, se normalizaron con los niveles de β-tubulina. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. *p<0.05 vs Control

3.2) El consumo de fructosa no produce inflamación, fibrosis o necrosis en hígado

Son numerosos los estudios que relacionan las vías de estrés de retículo e inflamación (Cnop y col., 2012), así como aquellos que encuentran una conexión directa entre una ingesta elevada de azúcares y un aumento de la permeabilidad intestinal que conduce a un estado inflamatorio en hígado (Spruss y col., 2009). Por este motivo, en el presente estudio se decidió analizar marcadores de inflamación, sobre todo a nivel hepático.

El primer parámetro a analizar fueron los niveles de endotoxinas presentes en plasma, observando cómo una suplementación con fructosa líquida al 10% (p/v) no era suficiente como para provocar un aumento de endotoxinas circulantes en plasma (figura V-41).

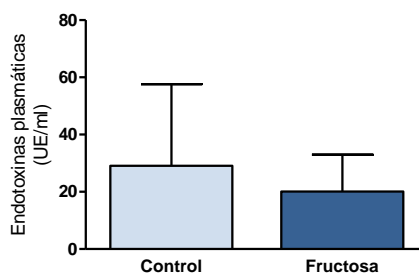


Figura V-41. Niveles plasmáticos de endotoxinas tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa.

Este análisis se confirmó al comprobar, mediante la técnica de PCR a tiempo real, los niveles de los genes *tlr-4* y *myd88*. En ambos casos, se observó cómo la ingesta de fructosa no provocaba ningún tipo de alteración en la expresión de estos genes en comparación con las ratas del grupo control (figura V-42).

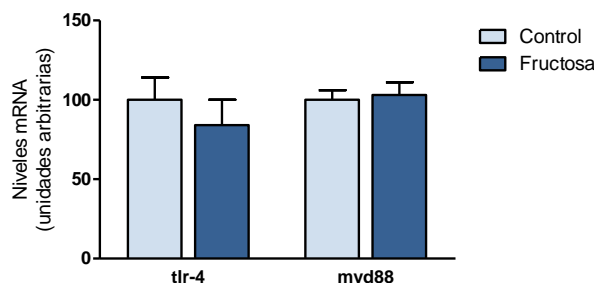


Figura V-42. Niveles de expresión de los genes *tlr-4* y *myd88* determinados en muestras hepáticas de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de *tbp*. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

Se examinó la activación del complejo proteico NF κ B, para comprobar si una ingesta de fructosa era capaz de provocar un estado inflamatorio en hígado, independientemente de los niveles de endotoxinas en plasma. Para ello, se analizaron los niveles de la proteína p65, factor de transcripción del complejo NF κ B, y se observó cómo las ratas que habían consumido fructosa presentaban los mismos niveles hepáticos de p65 en núcleo que aquellas que formaban parte del grupo control (figura V-43).

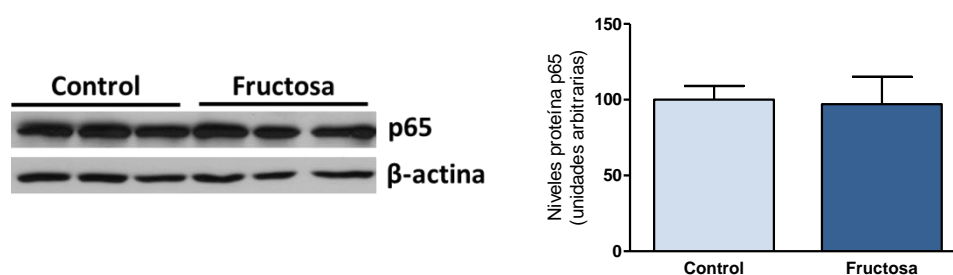


Figura V-43. Niveles de la proteína p65 determinados en muestras hepáticas de extracto nuclear de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -actina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Estos datos corroboran los datos obtenidos en el apartado anterior, donde no se observa modificación de ningún tipo a la hora de analizar el efecto de la fructosa sobre I κ B α y TNF α , marcadores también de inflamación.

Se analizó la expresión en hígado de otros marcadores de inflamación para descartar definitivamente un estado inflamatorio en el hígado de ratas suplementadas con fructosa líquida. Así, se observó como la expresión hepática de un miembro de la familia de receptores *NOD like* (*nucleotide-binding oligomerization domain like*), el gen *nlrp3* (*pyrin domain containing 3*), que codifica para la proteína NALP3 presente en el complejo del inflammasoma, no se vio alterada tras la ingesta de fructosa (figura V-44A). Tampoco se vio alterada la expresión del gen *mcp-1*, otro marcador típico de inflamación, en hígado de ratas suplementadas con fructosa líquida (figura V-44B).

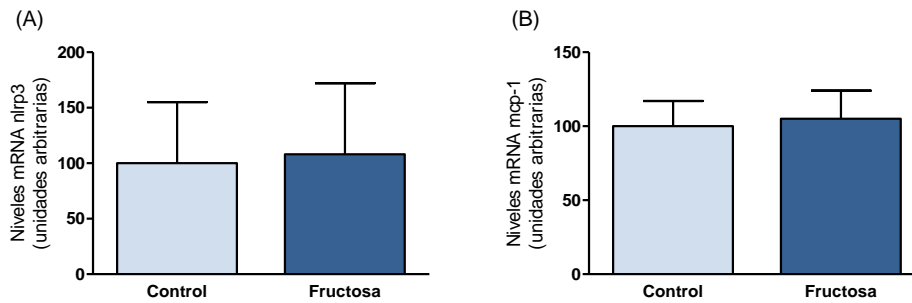


Figura V-44. Niveles de expresión del gen *nlrp3* (A) y *mcp-1* (B) normalizados con los niveles de *tbp* en muestras de hígado de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

Se determinaron también los niveles de metalotioneína-1 y metalotioneína-2 (*mt-1* y *mt-2*), proteínas sintetizadas en respuesta a una gran variedad de estímulos fisiológicos y químicos. En este caso, se observó cómo la ingesta de fructosa no sólo no aumenta los niveles de estos genes sino que provocaba una disminución de los mismos (figura V-45A). También se analizó con detalle la expresión del gen *pai-1* (*plasminogen activator inhibitor-1*), sin que la suplementación de fructosa produjese cambios en sus niveles, en comparación con las ratas del grupo control (figura V-45B).

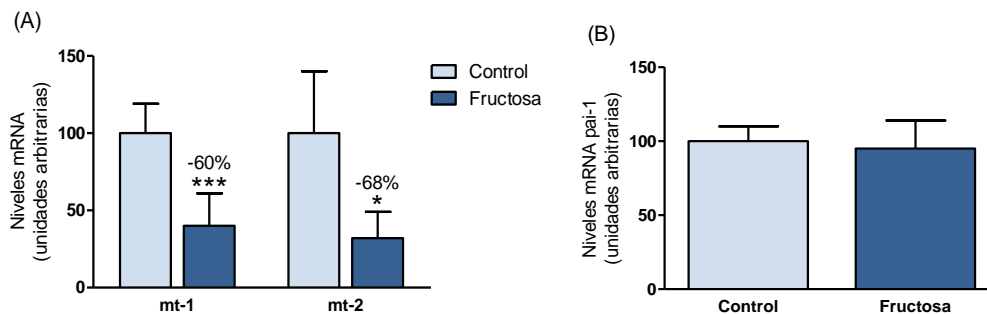


Figura V-45. Niveles de expresión de los genes *mt-1* y *mt-2* (A) y *pai-1* (B), normalizados con los niveles de *tbp* en muestras de hígado de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. * $p<0.05$ y *** $p<0.001$ vs Control.

Por último, se analizaron los niveles de expresión del gen *11 β -hsd1* (*11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1*), que codifica para una proteína que participa en la síntesis de cortisol, una molécula anti-inflamatoria. Se observó cómo en el hígado de ratas suplementadas con fructosa, la expresión de este gen no se vio modificada en comparación con las ratas control (figura V-46).

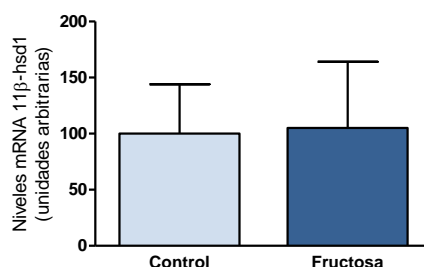


Figura V-46. Niveles de expresión del gen *11 β -hsd1* normalizados con los niveles de *tbp* en muestras de hígado de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

Se valoró también la capacidad de la fructosa de generar fibrosis en el hígado. Para ello, se analizaron los niveles de expresión génica del marcador colagenasa-1 (*coll α 1*) y se observó cómo la suplementación con fructosa líquida no producía ningún tipo de alteración en los niveles de este gen, en comparación con las ratas control (figura V-47).

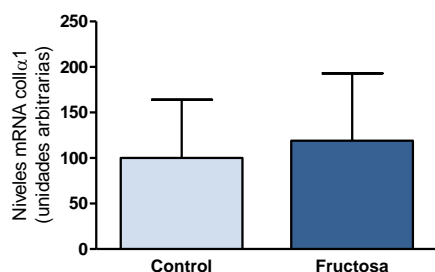


Figura V-47. Niveles de expresión del gen *coll α 1* normalizados con los niveles de *tbp* en muestras de hígado de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

Este resultado se confirmó gracias al estudio histológico del tejido hepático, mediante la tinción tricrómica de Masson (figura V-48), donde se observó cómo los animales que habían ingerido fructosa presentaban unos niveles similares de fibrosis hepática con respecto a los animales del grupo control.

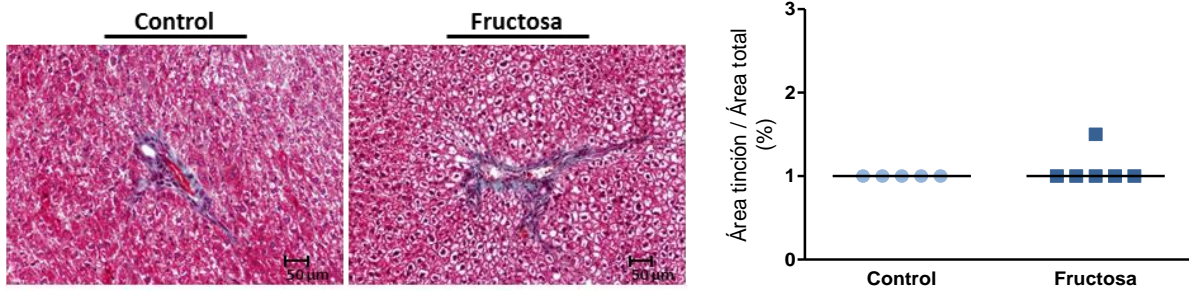


Figura V-48. Fibrosis hepática en ratas suplementadas 56 días con fructosa líquida. Las imágenes son representativas de secciones de hígado de ratas control (n=5) y de ratas fructosa (n=6). A la derecha, gráfico de dispersión que muestra los valores individuales de cada área teñida con tinción de Masson, calculada como el porcentaje del área teñida con respecto al área total. La línea horizontal indica la mediana de cada grupo.

También se valoró la capacidad de la fructosa de producir necrosis en hígado. Gracias al estudio histológico con tinción de hematoxilina y eosina, se determinó cómo los animales suplementados con fructosa presentaban los mismos niveles de necrosis hepática que los animales control (figura V-49).

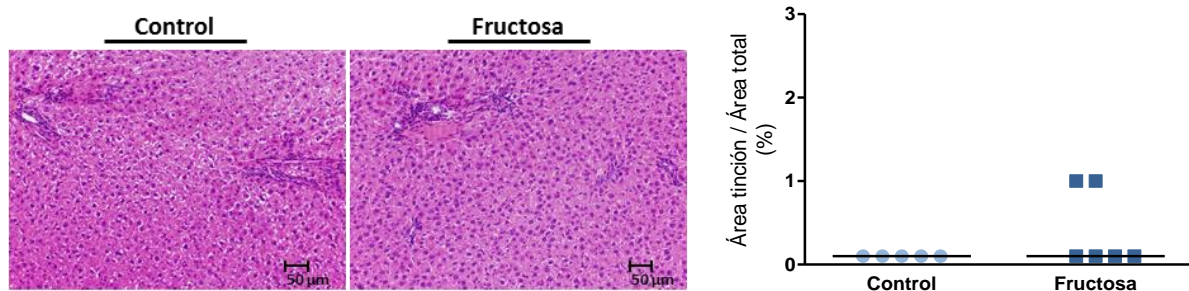


Figura V-49. Necrosis hepática en ratas suplementadas 56 días con fructosa líquida. Las imágenes son representativas de secciones de hígado de ratas control (n=5) y de ratas fructosa (n=6). A la derecha, gráfico de dispersión que muestra los valores individuales de cada área teñida con hematoxilina y eosina, calculada como el porcentaje del área teñida con respecto al porcentaje área total. La línea horizontal indica la mediana de cada grupo.

Además de en el hígado, también se valoró la posibilidad de que la ingesta de fructosa produjese inflamación en el tejido adiposo. Para ello, se analizaron los niveles de expresión de genes marcadores de inflamación, como es el caso de *tlr-4*, *myd88*, *tnfa*, *mcp-1* y *pai-1*. De esta manera se observó como las ratas suplementadas con fructosa presentaban los mismos niveles de expresión génica de todos estos marcadores, en comparación con las ratas del grupo control (figura V-50).

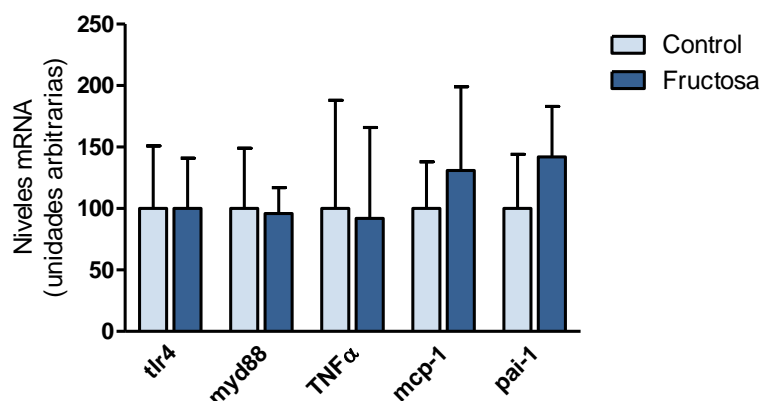


Figura V-50. Niveles de expresión de los genes *tlr-4*, *myd88*, *tnfa*, *mcp-1* y *pai-1* normalizados con los niveles de *18s* en muestras de tejido adiposo de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

Al igual que en hígado, se analizó la expresión del gen *11 β -hsd1* en tejido adiposo. Mediante la técnica de PCR a tiempo real se determinó cómo los niveles de expresión de este gen eran los mismos en ratas que habían ingerido fructosa con respecto a las ratas control (figura V-51).

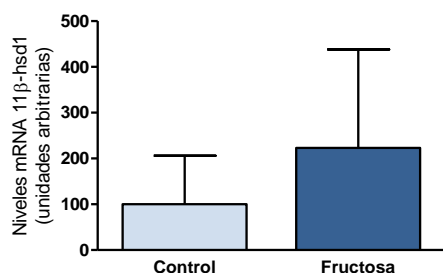


Figura V-51. Niveles de expresión del gen *11 β -hsd1*, normalizados con los niveles de *18s* en muestras de tejido adiposo de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

Por último, también se valoró la expresión del gen *coll α 1* en tejido adiposo, para estudiar el posible efecto de la fructosa sobre la fibrosis en este tejido. Se observó que los niveles de este gen eran similares en ratas suplementadas con fructosa que en ratas del grupo control (figura V-52).

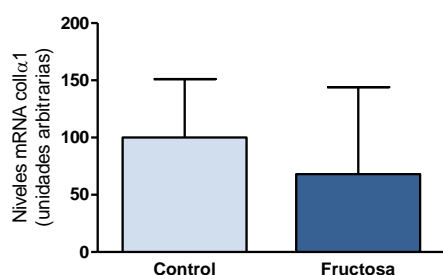


Figura V-52. Niveles de expresión del gen *coll α 1* normalizados con los niveles de *18s* en muestras de tejido adiposo de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

3.3) El consumo de fructosa no produce estrés oxidativo en hígado y tampoco en tejido adiposo

Debido a los numerosos estudios que proponen al estrés oxidativo como posible causante de una resistencia a la insulina, se decidió analizar los niveles de marcadores como *nrf2*, *sod2* y *gpx1*, tanto a nivel hepático, como a nivel de tejido adiposo. Gracias a la técnica de PCR a tiempo real se determinó cómo en hígado de ratas fructosa, a pesar de una disminución de la expresión de *nrf2*, los niveles de los genes diana para este factor de transcripción no presentaban cambios con respecto a las ratas control (figura V-53).

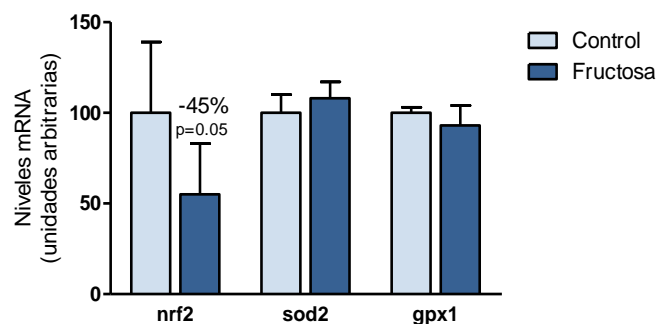


Figura V-53. Niveles de expresión de los genes *nrf2*, *sod2* y *gpx1* normalizados con los niveles de *tbp* en muestras de hígado de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

En tejido adiposo, a la hora de estudiar los niveles de estos tres marcadores, se observó cómo la suplementación con fructosa no inducía ningún cambio en la expresión de ninguno de estos tres genes, en comparación con las ratas control (figura V-54).

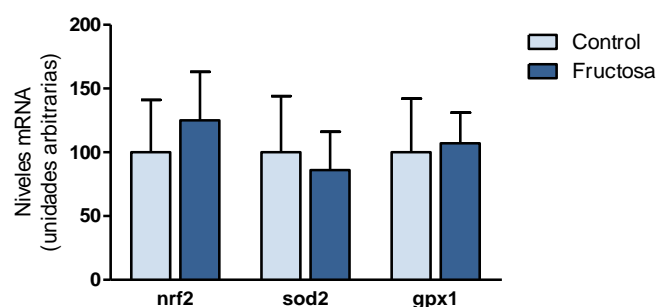


Figura V-54. Niveles de expresión de los genes *nrf2*, *sod2* y *gpx1* normalizados con los niveles de *18s* en muestras de tejido adiposo de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

Estos datos descartan cualquier tipo de estrés oxidativo inducido por la ingesta de fructosa líquida, ya sea en el hígado o en el tejido adiposo, en nuestro modelo experimental.

4) EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON UN 10% (P/V) DE FRUCTOSA EN EL AGUA DE BEBIDA DE LA DIETA DE RATA SPRAGUE-DAWLEY HEMBRA DURANTE 56 DÍAS SOBRE LA AUTOFAGIA HEPÁTICA

4.1) El consumo de fructosa provoca una activación hepática de mTOR, dependiente de TSC1/2

Se estudió el posible efecto del consumo de fructosa sobre la vía de la autofagia hepática. Para ello, primero se analizaron los niveles fosforilados en Ser²⁴⁸¹ y totales de la proteína mTOR, uno de los principales reguladores de la actividad autofágica. Tal y como ya se había visto en estudios previos en nuestro laboratorio (Rebollo y col., 2014a), y gracias a la técnica de Western Blot, se observó cómo la ingesta de fructosa aumentaba los niveles hepáticos de fosforilación de mTOR en el residuo Ser²⁴⁸¹, en comparación con las ratas del grupo control (figura V-55).

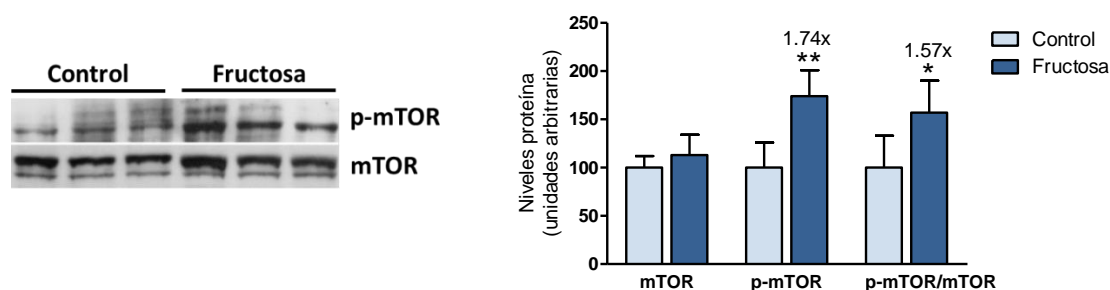


Figura V-55. Niveles de la proteína mTOR, tanto en su forma fosforilada en residuo Ser²⁴⁸¹ como en su forma total, así como la relación mTOR fosforilada con respecto a mTOR total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. La uniformidad de carga se comprobó por tinción de las membranas con Roig Ponceau. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. * $p<0.05$ y ** $p<0.01$ vs Control.

Esta activación por fosforilación de mTOR se confirmó al analizar el nivel de fosforilación de la proteína 4E-BP1 en el residuo Thr^{37/45}, que se vio incrementado en el hígado de aquellas ratas que habían consumido fructosa, en comparación con las ratas control (figura V-56).

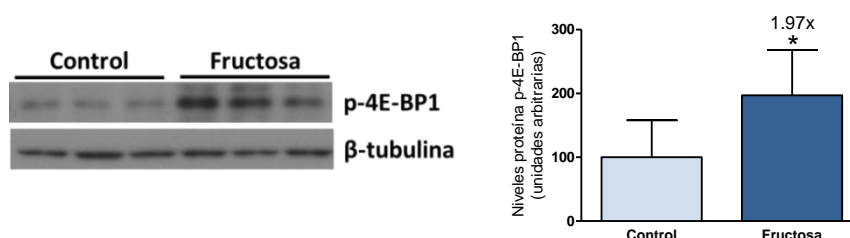


Figura V-56. Niveles de fosforilación de la proteína 4E-BP1 en residuo Thr^{37/46} determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. * $p<0.05$ vs Control.

Sin embargo, se estudió el nivel de fosforilación hepática de rpS6 en el residuo Ser^{235/236}, otra proteína diana de mTOR, pero en este caso no se observó un aumento en este aspecto en ratas suplementadas con fructosa, en comparación con las ratas del grupo control (figura V-57).

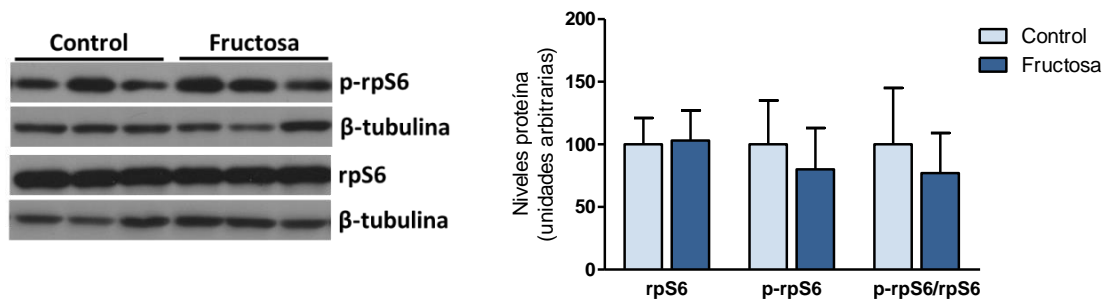


Figura V-57. Niveles de la proteína rpS6, tanto en su forma fosforilada en residuo Ser^{235/236} como en su forma total, así como la relación rpS6 fosforilada con respecto a rpS6 total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. Tanto la forma fosforilada como la forma total se normalizaron con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Se investigó qué proteína podría ser la responsable de la activación de mTOR en ratas suplementadas con fructosa. Se analizaron los niveles de fosforilación de la proteína TSC2, que forma parte del complejo TSC1/2, en su residuo inhibitorio Thr¹⁴⁶². De esta forma se observó cómo el hígado de las ratas que habían ingerido fructosa presentaban unos niveles de fosforilación para este residuo muy superiores, en comparación con las ratas del grupo control (figura V-58), lo que podría explicar la activación de mTOR en este grupo.

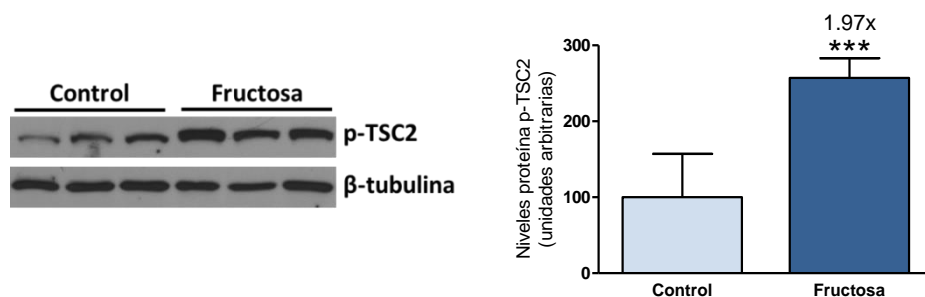


Figura V-58. Niveles de fosforilación de la proteína TSC2 en el residuo Thr¹⁴⁶² determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. ***p<0.001 vs Control.

A continuación, se realizó una búsqueda de la cinasa capaz de fosforilar a TSC2. Entre las cinasas analizadas cabe destacar p38, Akt, Erk1/2, AMPK α y GSK3 β . Debido a que todas ellas también juegan un papel importante en la vía de señalización de la insulina, los análisis de estas proteínas se detallan más adelante, aunque ninguna de ellas resultó ser la responsable de la fosforilación de TSC2 en ratas suplementadas con fructosa.

Además de TSC2, se analizaron otros marcadores capaces de provocar la activación hepática de mTOR en las ratas fructosa. Mediante la técnica de co-inmunoprecipitación, se estudió el posible efecto que podría tener una ingesta de fructosa en el grado de interacción entre distintas proteínas. De esta forma, se estudió la asociación entre las proteínas Rheb-mTOR, Rheb-GAPDH, mTOR-Telo2 y mTOR-RagC; y se observó cómo la suplementación con fructosa líquida no producía alteración alguna en el grado de interacción de estas parejas de proteínas (figura V-59).

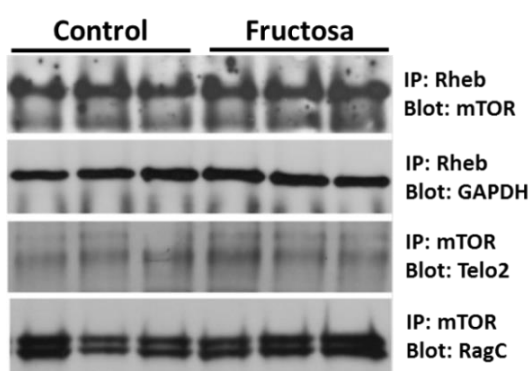


Figura V-59. Imágenes representativas del ensayo de Co-IP para la detección del grado de asociación entre diferentes proteínas en muestras de proteína total de hígado de rata tras 56 días de estudio. IP, proteína para la cual se inmunoprecipita antes de realizar el Western Blot; Blot, proteína para la cual se realiza la incubación de la membrana. Se hicieron pools de las muestras de proteína total de partida, con $n=3$ muestras procedentes del grupo control y $n=4$ muestras procedentes del grupo fructosa.

Además, se analizaron los niveles proteicos de estos marcadores y, al igual que ocurría en la co-inmunoprecipitación, la ingesta de fructosa no produjo ningún tipo de alteración en la expresión proteica total de estos marcadores con respecto a las ratas control (figura V-60).

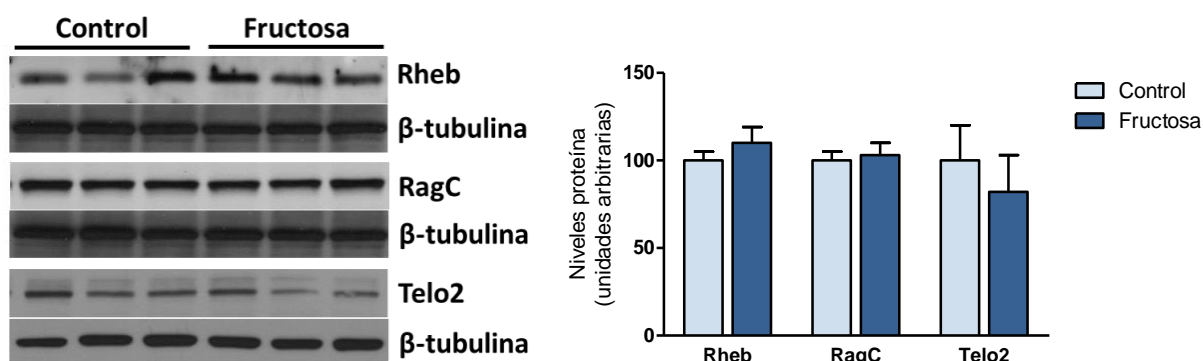


Figura V-60. Niveles de las proteínas Rheb, RagC y Telo2 determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

También se estudió la posibilidad de que la activación de mTOR fuese regulada por el complejo multiproteico Tel2-Tti1-Tti2 (TTT)-RUVBL1/2. Kim y colaboradores (2013) demostraron una correlación positiva entre los niveles de mRNA mensajero de las proteínas que forman parte de este complejo y la actividad de mTOR. Así, se analizó la expresión de los genes que codifican para las proteínas RUVBL1 y Tti1 y se observó cómo la suplementación con fructosa no producía un incremento en los niveles de estos genes, en comparación con las ratas del grupo control (figura V-61).

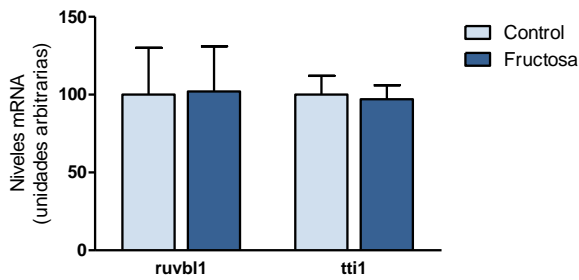


Figura V-61. Niveles de expresión de los genes *ruvbl1* y *tti1* normalizados con los niveles de *tbp* en muestras de hígado de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

4.2) El consumo de fructosa provoca un descenso en la actividad autofágica hepática

A continuación, se analizó el efecto que esta activación por fosforilación de mTOR en ratas suplementadas con fructosa podía tener en la vía de la autofagia hepática. Tal y como era de esperar, una activación de mTOR produjo una alteración en varios marcadores que participan en la autofagia en ratas que habían ingerido fructosa líquida.

El primero de estos marcadores analizados fue la proteína Ulk1, que participa en el proceso de iniciación de la autofagia y, que además, es diana de mTOR. Se analizó el nivel de fosforilación de esta proteína en el residuo inhibitorio Ser⁷⁵⁷; y se observó cómo las ratas fructosa presentaban un mayor grado de fosforilación para este residuo (casi 3 veces), en comparación con las ratas control (figura V-62).

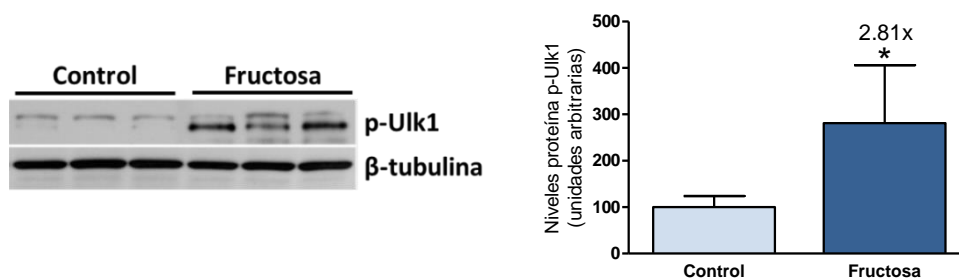


Figura V-62. Niveles de fosforilación de la proteína Ulk1 en residuo Ser⁷⁵⁷ determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de proteína β-tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. * $p<0.05$ vs Control.

Se analizó otro marcador característico de autofagia, como es la proteína LC3B, que participa en la etapa de elongación de la misma. LC3B se puede presentar en dos isoformas: LC3B-I y LC3B-II, de menor peso molecular. Durante el proceso de autofagia, LC3B-I se convierte en LC3B-II gracias a la acción de otras proteínas implicadas en la regulación de dicho proceso. Esta segunda isoforma es capaz de asociarse a las vesículas autofágicas, permitiendo así que la autofagia tenga lugar. Al analizar los niveles de las dos isoformas de LC3B se observó cómo la isoforma LC3B-II o, lo que es lo mismo, la relación LC3B-II/I se encontraba disminuida en ratas suplementadas con fructosa, al compararla con ratas del grupo control (figura V-63).

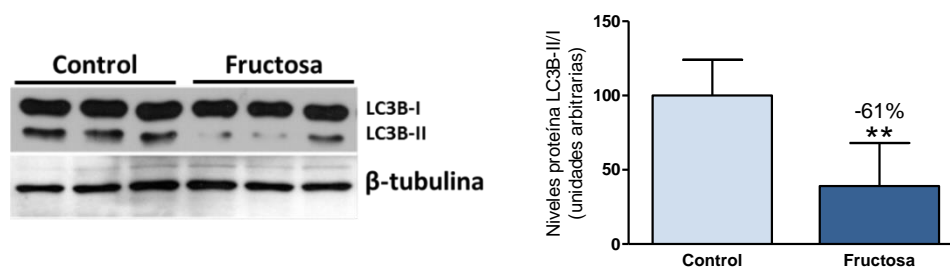


Figura V-63. Relación de las isoformas LC3B-II/I determinada en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizada para los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. $**p<0.01$ vs Control.

Otro marcador de autofagia analizado en hígado fue p62. Esta proteína actúa como marcador de este proceso, ya que su eliminación del citoplasma es debida principalmente al fenómeno de autofagia. Se analizaron los niveles de p62 en citoplasma y se observó cómo el hígado de las ratas suplementadas con fructosa presentaban unos niveles más altos de p62 en comparación con las ratas control (figura V-64), lo que podría ser indicativo de una disminución del proceso autofágico en las ratas que consumieron fructosa.

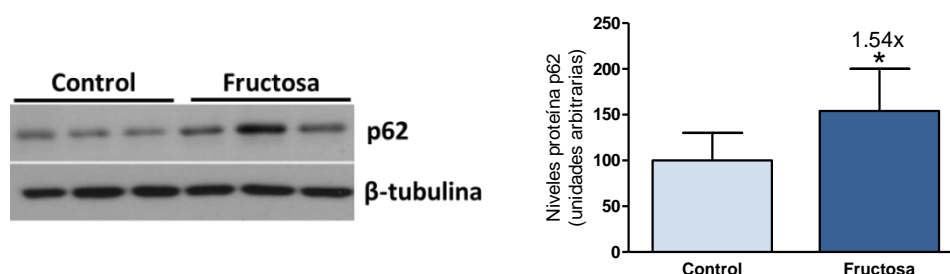


Figura V-64. Niveles de la proteína p62 determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. $*p<0.05$ vs Control.

A pesar de estas alteraciones observadas en los niveles de algunos marcadores de autofagia en el hígado de ratas suplementadas con fructosa, también se analizaron otros marcadores de este proceso en los que no se observó un incremento o un descenso en sus niveles de expresión. Es el caso de las proteínas lamp1 y beclina1, que no vieron alterados sus niveles después de una ingesta de fructosa líquida (figura V-65).

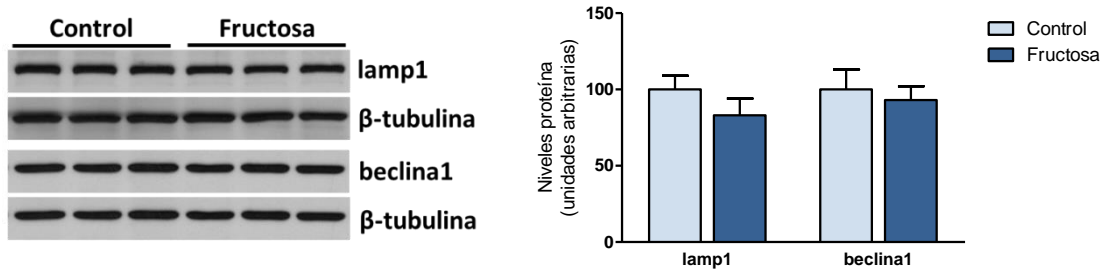


Figura V-65. Niveles de las proteínas lamp1 y beclina1 determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β-tubulina. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

5) EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON UN 10% (P/V) DE FRUCTOSA EN EL AGUA DE BEBIDA DE LA DIETA DE RATA SPRAGUE-DAWLEY HEMBRA DURANTE 56 DÍAS SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA A NIVEL HEPÁTICO

5.1) El consumo de fructosa produce una disminución de la sensibilidad a la insulina en hígado

Dada la gran cantidad de estudios que relacionan una ingesta alta de carbohidratos con fenómenos de resistencia a la insulina, en el presente trabajo también se estudió el efecto que el consumo de fructosa en forma líquida durante 56 días podía tener sobre la vía de señalización de la insulina en el hígado, principal órgano metabolizador de este azúcar procedente de la dieta.

El primer parámetro a valorar en este aspecto fue el índice de sensibilidad a la insulina (ISI). Teniendo en cuenta los valores obtenidos de glucosa e insulina plasmática anteriormente descritos, y en los que se observó que las ratas suplementadas con fructosa presentaban normoglucemia e hiperinsulinemia, se determinó que las ratas de este grupo presentaban un ISI ligeramente menor a las ratas del grupo control (figura V-66).

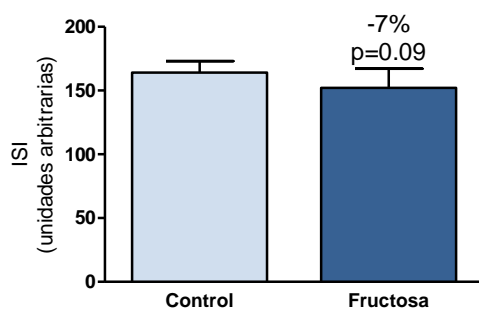


Figura V-66. Índice de sensibilidad a la insulina calculado según la fórmula: $2/[(\text{Insulina plasmática } (\mu\text{M}) \times \text{glucosa plasmática } (\mu\text{M}) + 1)]$. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

5.2) El consumo de fructosa produce una disminución en la vía de señalización Akt/PI3K en hígado

Debido a esta ligera disminución del índice de sensibilidad a la insulina en ratas suplementadas con fructosa, se quiso analizar la cantidad y/o la activación de diferentes proteínas que participan en la cascada de señalización de la insulina en hígado; en concreto, las proteínas implicadas en la vía PI3K/Akt.

En primer lugar, se analizaron los niveles de las proteínas IRS1 e IRS2, situadas en una posición muy inicial en la vía de transducción de señal por insulina. Se observó cómo las ratas fructosa presentaban los mismos niveles de proteína IRS1 en hígado que las ratas del grupo control; pero cuando se analizaron los niveles de IRS2, isoforma predominante en este tejido, se detectó que las ratas que habían ingerido fructosa presentaban unos valores muy inferiores de esta proteína en comparación con las ratas del grupo control (figura V-67).

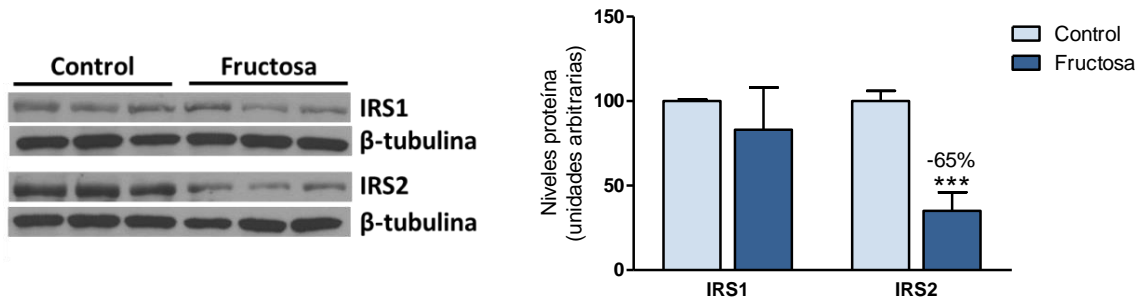


Figura V-67. Niveles de las proteínas IRS1 e IRS2 determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio, normalizados con los niveles de proteína β-tubulina. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. *** p<0.001 vs Control.

Estos datos concuerdan con los obtenidos en estudios previos (Rebollo y col., 2014a), y la disminución observada en los niveles totales de proteína IRS2 podría explicarse mediante un aumento en la expresión de miRNAs, concretamente del 3p miRNA-33. Goedeke y colaboradores (2013) demuestran cómo esta pequeña secuencia de nucleótidos es capaz de disminuir los niveles de proteína de IRS2. Efectivamente, al analizar los niveles de 3p miRNA-33 en muestras de hígado, se observó cómo las ratas que habían ingerido fructosa presentaban unos valores más elevados de este miRNA en comparación con las ratas control (figura V-68).

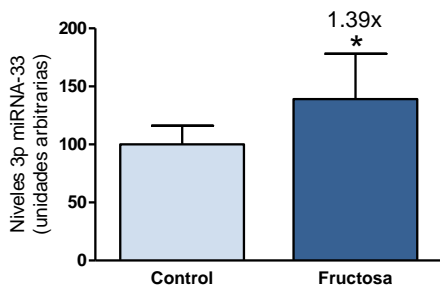


Figura V-68. Niveles de expresión de 3p miRNA-33 normalizados con los niveles de RNU6 en muestras de hígado de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. *p<0.05 vs Control.

Otra proteína que podría causar una disminución en los niveles de IRS2 es SOCS3 (Emanuelli y col., 2000; Rui y col., 2002), la expresión de la cual se induce en respuesta a diversas citoquinas y que podría provocar así un estado de resistencia a la insulina. Sin embargo, al analizar los niveles de esta proteína en hígado de rata, se observó cómo éstos eran similares en las ratas que habían ingerido fructosa en comparación con las ratas del grupo control (figura V-69).

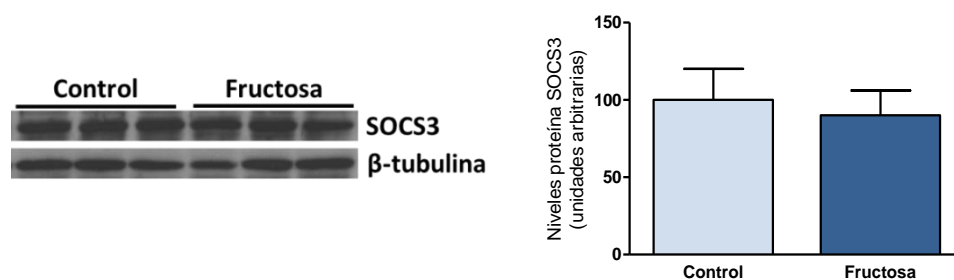


Figura V-69. Niveles de la proteína SOCS3 determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio normalizados con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente en sayo de Western Blot.

La proteína IRS2 es clave en la transducción de la señal iniciada a través del receptor de insulina en hígado (Schinner y col., 2005). Por tanto, la reducción de los niveles de esta proteína en el hígado de las ratas que habían consumido fructosa durante 56 días podría ser el determinante en la aparición de un estado de resistencia a la insulina. Así, con el objetivo de confirmar que la señalización de la insulina era deficiente en este grupo de estudio, se analizó el grado de fosforilación (indicativo de la activación de la vía) de algunas proteínas implicadas en la transducción de la señal de insulina, como por ejemplo, Akt y una proteína diana de ésta, GSK3 β .

Se analizaron los niveles de fosforilación de estas dos proteínas, con el objetivo de determinar un déficit en la vía de señalización de la insulina en hígado de ratas fructosa. De esta forma, se observó que, a pesar de que estas ratas presentaban hiperinsulinemia, el grado de fosforilación de Akt y de GSK3 β no resultó incrementado (figura V-70 y figura V-71, respectivamente).

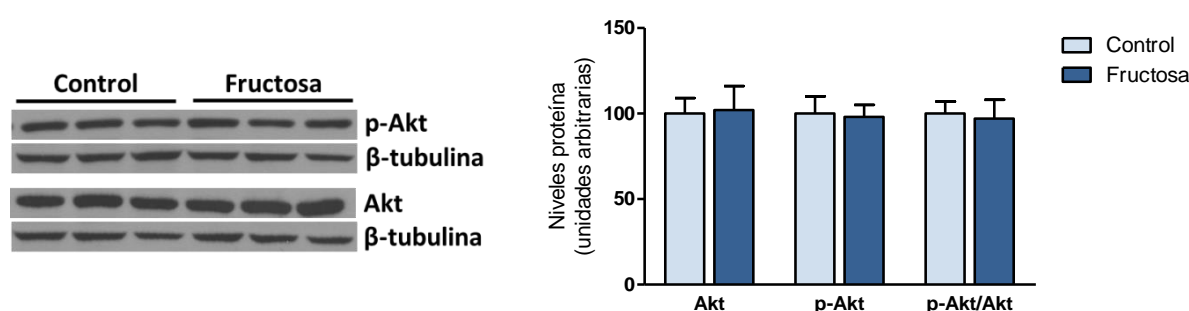


Figura V-70. Niveles de la proteína Akt, tanto en su forma fosforilada en residuo Ser⁴⁷³ como en su forma total, así como la relación Akt fosforilada con respecto a Akt total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. Tanto la forma fosforilada como la forma total se normalizaron con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente en sayo de Western Blot.

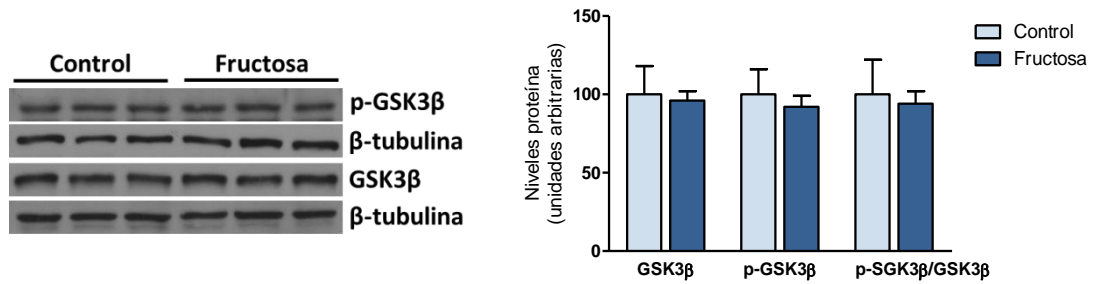


Figura V-71. Niveles de la proteína GSK3β, tanto en su forma fosforilada en residuo Tyr²¹⁶ como en su forma total, así como la relación GSK3β fosforilada con respecto a GSK3β total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. Tanto la forma fosforilada como la forma total se normalizaron con los niveles de β-tubulina. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Dado que el grado de fosforilación de Akt no aumentó en ratas fructosa a pesar de la hiperinsulinemia que éstas presentaban, se quiso estimar el nivel de disminución de señalización de la vía insulina-Akt. Para ello, se calculó la relación p-Akt/insulina plasmática y se observó cómo ésta disminuía en ratas suplementadas con fructosa en comparación con las ratas control (figura V-72).

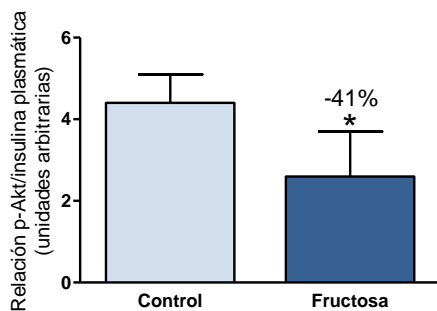


Figura V-72. Estimación de la disminución de la señalización por insulina en hígado de ratas tras 56 días de estudio, calculada mediante la relación p-Akt/insulina plasmática. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. *p<0.05 vs Control.

5.3) El consumo de fructosa produce una reducción en la gluconeogénesis hepática dependiente de la inactivación de FoxO1

Una proteína clave en la señalización por insulina en el tejido hepático y en la regulación de la homeostasis de la glucosa es el factor de transcripción FoxO1, cuya regulación está mediada por numerosas proteínas. Una de las más importantes, es la cinasa Akt, que puede fosforilar a FoxO1 en su residuo Ser²⁵⁶, provocando así su inactivación por retención citosólica.

Se analizó el grado de fosforilación de FoxO1 y se observó como las ratas que habían ingerido fructosa presentaban unos niveles elevados de la fosforilación de esta proteína, en comparación con las ratas del grupo control (figura V-73). Fenómeno extraño, ya que las ratas del grupo fructosa, tal y como se ha mencionado anteriormente, presentaban el mismo grado de fosforilación de Akt que las ratas del grupo control.

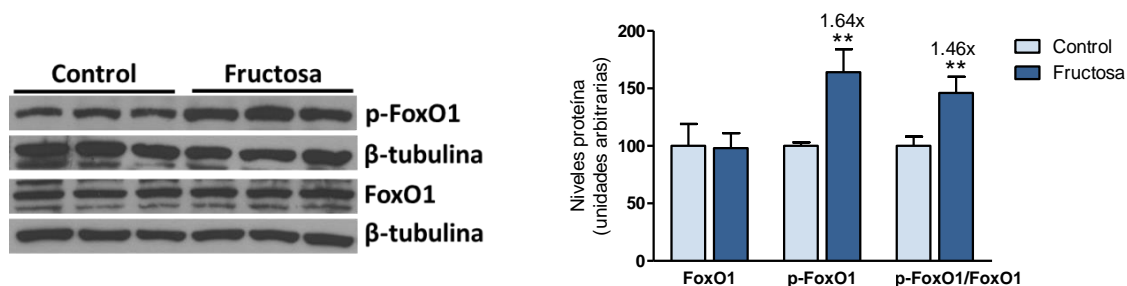


Figura V-73. Niveles de la proteína FoxO1, tanto en su forma fosforilada en residuo Ser²⁵⁶ como en su forma total, así como la relación FoxO1 fosforilada con respecto a FoxO1 total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. Tanto la forma fosforilada como la forma total, se normalizaron con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. **** $p < 0.01$ vs Control.**

De forma contraria a lo que esperaríamos en condiciones de resistencia a la insulina a nivel hepático, pero en concordancia con los resultados anteriores, la expresión génica de *pepck* y *g6pc* (genes diana de FoxO1 implicados en el proceso de gluconeogénesis) se encontró reducida en el hígado de las ratas suplementadas con fructosa, tanto a nivel de mRNA (figura V-74) como a nivel de proteína (figura V-75).

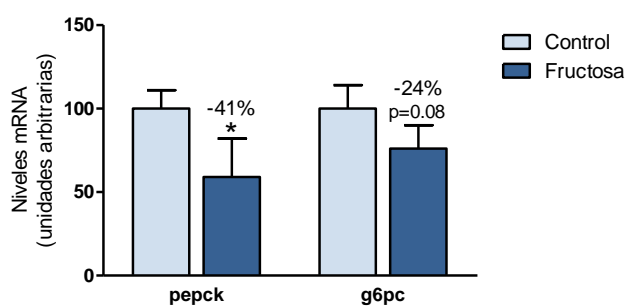


Figura V-74. Niveles de expresión de los genes *pepck* y *g6pc* normalizados con los niveles de *tbp* en muestras de hígado de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. *** $p < 0.05$ vs Control.**

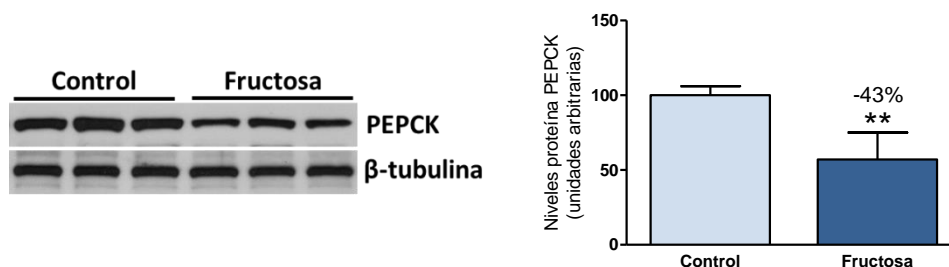


Figura V-75. Niveles de la proteína PEPCK determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de proteína β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. **** $p < 0.01$ vs Control.**

Una vez demostrado que la suplementación con fructosa líquida induce un aumento en la fosforilación e inactivación de FoxO1 de manera independiente a Akt y que este fenómeno comporta una disminución en la expresión de genes gluconeogénicos, se estudió qué proteínas eran capaces de regular esta fosforilación en el residuo Ser²⁵⁶ de FoxO1.

La primera de ellas fue la fosfatasa MKP-3, capaz de eliminar grupos fosfato de sus proteínas diana, entre las que se encuentra FoxO1. Wu y colaboradores (2010) demostraron cómo una reducción en los niveles de esta fosfatasa provocaba un descenso de la concentración de glucosa en plasma. En el presente estudio se analizaron los niveles en hígado de expresión proteica de MKP-3 y se observó cómo éstos eran inferiores en ratas fructosa con respecto a ratas control (figura V-76).

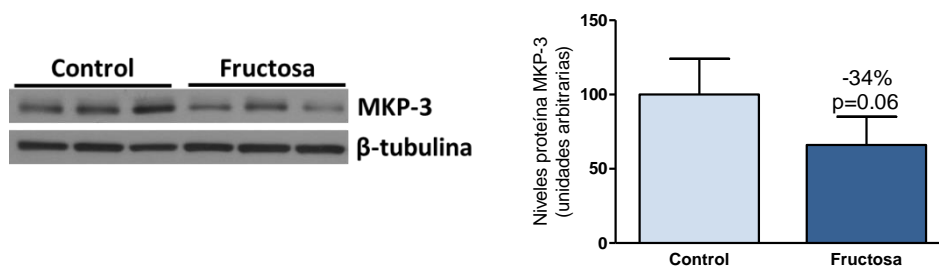


Figura V-76. Niveles de la proteína MKP-3 determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de proteína β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Estos datos sugieren que el aumento en el grado de fosforilación de FoxO1 en ratas fructosa podría ser debido a una disminución en la expresión de la proteína MKP-3, ya que la capacidad de eliminar grupos fosfato de FoxO1 se vería reducida en el hígado de estos animales.

Otra proteína capaz de regular el control hepático de la gluconeogénesis dependiente de FoxO1 es PMRT1. Han y colaboradores (2014) demostraron cómo una sobreexpresión de PMRT1 promueve un aumento en la gluconeogénesis en hepatocitos, mientras que una inhibición de la misma reduce la síntesis de glucosa hepática al aumentar la fosforilación del residuo Ser²⁵⁶ de FoxO1. En el presente estudio se estudiaron los niveles hepáticos de mRNA que codifica para PMRT1, pero no se observaron cambios en los mismos al comparar el grupo de ratas fructosa con el grupo control (figura V-77).

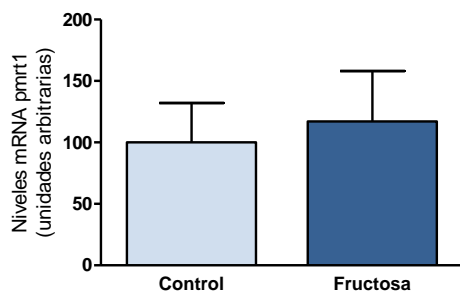


Figura V-77. Niveles de expresión del gen *pmrt1* normalizados con los niveles de *tbp* en muestras de hígado de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa.

A continuación se estudió el grado de fosforilación (y por lo tanto de activación) de una serie de cinasas capaces de fosforilar a FoxO1 en su residuo Ser²⁵⁶ y, por lo tanto, de provocar una inactivación del mismo.

La primera de esas cinasas fue la MAPK p38, una proteína implicada en una gran variedad de procesos, entre los que se encuentra la activación de la gluconeogénesis inducida por ácidos grasos. Estudios previos en nuestro laboratorio (Rebollo y col., 2014a) mostraron cómo un aumento en el grado de fosforilación de la proteína p38 podría ser el responsable de la inactivación de FoxO1, gracias a la fosforilación de este factor de transcripción.

En el presente estudio se analizó el grado de fosforilación en el residuo Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸² de esta proteína y se observó que no había diferencias en el mismo al comparar las ratas fructosa con las ratas control (figura V-78).

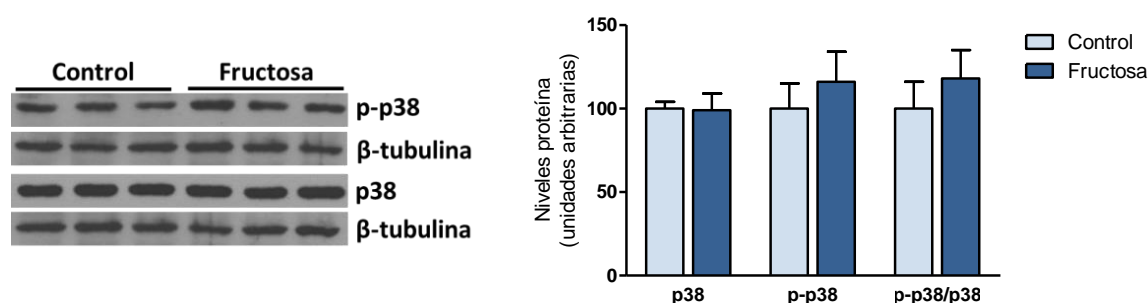


Figura V-78. Niveles de la proteína p38, tanto en su forma fosforilada en residuo Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸² como en su forma total, así como la relación p38 fosforilada con respecto a p38 total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. Tanto la forma fosforilada como la forma total se normalizaron con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ para las ratas del grupo control y $n=8$ para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Otra cinasa importante en la regulación de la gluconeogénesis es la Erk1/2. Jiao y colaboradores (2013) demostraron que una activación excesiva de la vía de esta cinasa suprimía la expresión del gen *g6pc*, mediante la fosforilación de FoxO1. En el presente estudio, se determinó el grado de fosforilación de Erk y se observó cómo una suplementación con fructosa líquida no inducía alteración en este aspecto, comparado con las ratas del grupo control (figura V-79).

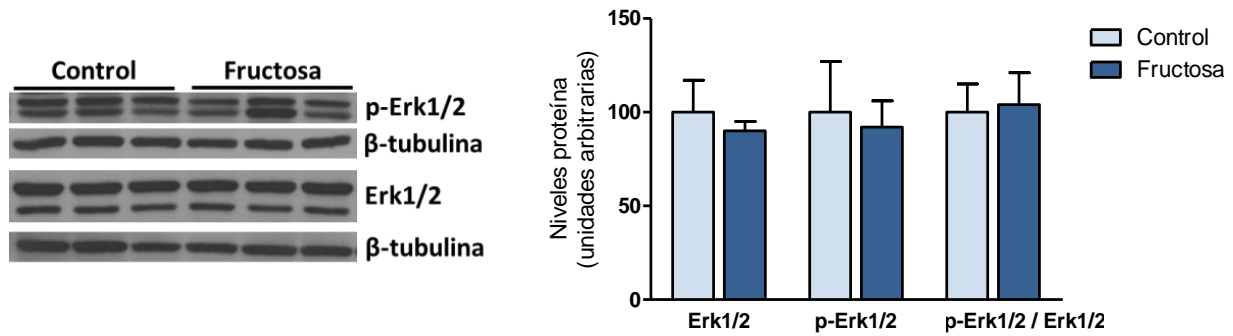


Figura V-79. Niveles de la proteína Erk, tanto en su forma fosforilada en residuo Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ como en su forma total, así como la relación Erk fosforilada con respecto a Erk total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. Tanto la forma fosforilada como la forma total se normalizaron con los niveles de β-tubulina. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

La cinasa SGK también juega un papel importante en la regulación de la gluconeogénesis mediante la fosforilación de FoxO1. Se ha descrito que para que SGK se active completamente debe sufrir fosforilación en sus residuos Ser⁴²² y Thr²⁵⁶ (Park y col., 1999). La primera de ellas es dependiente de la actividad del complejo mTORC2, mientras que la segunda es dependiente de la vía Akt-PDK. En el presente estudio se evaluó el grado de fosforilación en ambos residuos y se observó que la suplementación con fructosa inducía un aumento de más del doble en la fosforilación del residuo Ser⁴²² (figura V-80).

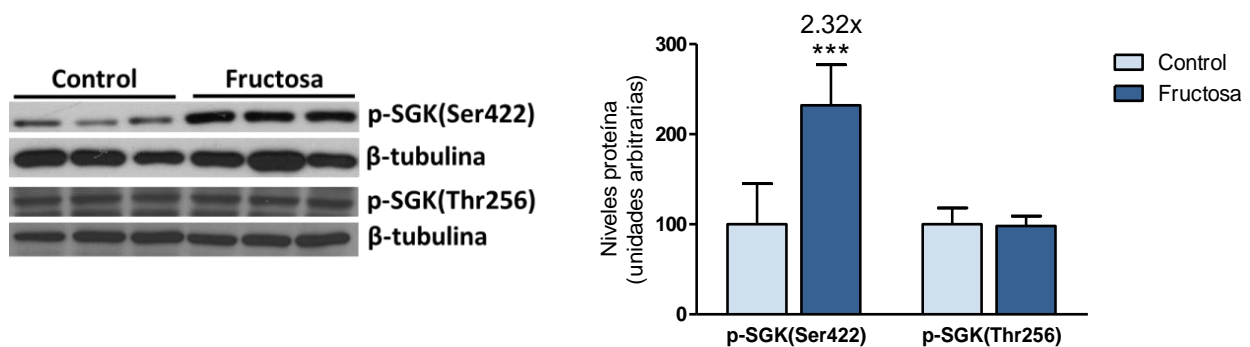


Figura V-80. Niveles de la proteína SGK, en su forma fosforilada en residuo Ser⁴²² y Thr²⁵⁶ determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β-tubulina. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=6 para las ratas del grupo control y n=8 para las ratas del grupo fructosa. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

6) LA SUPLEMENTACIÓN CON FRUCTOSA EN CONDICIONES ISOCALÓRICAS CON GLUCOSA INHIBE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN SUS ÓRGANOS DIANA

Recientemente, Benhamed y colaboradores (2012) han demostrado cómo una sobreexpresión del factor de transcripción ChREBP en el hígado de ratones protege frente a una resistencia a la insulina, así como a fenómenos de inflamación, a pesar de que estos ratones presentan una elevada esteatosis hepática debida al aumento en la actividad SCD1 en este tejido, que provoca un incremento en el ratio ácidos grasos poliinsaturados (MUFAs) / ácidos grasos saturados (SFAs).

Teniendo en cuenta este estudio, se observó un cierto paralelismo entre el modelo experimental de Benhamed y colaboradores y los resultados obtenidos hasta la fecha con los animales del estudio 1. Así, los animales de este primer estudio que habían consumido fructosa, presentaban una clara esteatosis hepática, con un aumento en los niveles de la proteína ChREBP (hasta 6 veces mayor) y un incremento en la actividad SCD1 en hígado. Además, en estos animales los marcadores de inflamación indicaban una ausencia de la misma, tanto a nivel hepático como en el tejido adiposo, y el hígado parecía responder a un estado atípico de resistencia a la insulina, pues los marcadores gluconeogénicos en este tejido se encontraban disminuidos.

Llegados a este punto, se consideró de vital importancia la realización de un test de tolerancia a la glucosa, con el objetivo de esclarecer si realmente las ratas suplementadas con fructosa presentaban una alteración real en el metabolismo de la glucosa y de ser así, si ésta era de origen hepático o extrahepático. Por este motivo se realizó un segundo estudio, repitiendo las mismas condiciones que en el estudio anterior; es decir, suplementar al grupo fructosa con un 10% (p/v) de este azúcar en el agua de bebida durante un tiempo de 56 días. Pero además, para este segundo estudio, se añadió un tercer grupo experimental: ratas suplementadas con glucosa con un porcentaje variable entre el 8 y el 10% (p/v), ya que diariamente se ajustaba el mismo con el fin de que la ingesta calórica total ingerida por estas ratas fuese la misma que la ingerida por las ratas del grupo fructosa. De esta forma, ambos grupos experimentales consumieron unas calorías totales similares al final del estudio, por lo que las diferencias observadas posteriormente entre estos dos grupos fueron debidas exclusivamente a las propiedades de cada carbohidrato y no a una diferencia de ingesta calórica total entre el grupo fructosa y el grupo glucosa.

Otra diferencia entre el estudio 1 y el estudio 2 fue que, en este segundo caso, en el día de sacrificio de los animales y 10 minutos antes del mismo, a 6 ratas de cada condición experimental se les administró por vía intraperitoneal una dosis de 0.5 unidades de insulina/g de peso, con el objetivo de determinar posibles alteraciones en la activación por fosforilación de diferentes proteínas que participan en la vía de señalización de la insulina, producidas por el consumo de ambos carbohidratos.

6.1) Tanto el consumo de fructosa como el de glucosa provocan un incremento en la ingesta energética sin aumentar el peso de los animales

Las ratas a las cuales se les suplementó la dieta con fructosa o glucosa, consumieron en torno a 4 veces más bebida (figura V-81A) y un 40% menos de pienso (figura V-81B) que las ratas control. Teniendo en cuenta que las soluciones de fructosa y glucosa al 10% y la dieta sólida aportan 0.4 Kcal/ml y 2.9 Kcal/g, respectivamente, los animales que siguieron la dieta suplementada con alguno de los dos azúcares consumieron 1.6 veces más calorías que los animales control (figura V-81C), por lo que la reducción de la ingesta de pienso no fue suficiente como para compensar el gran aporte energético proveniente de la fructosa o de la glucosa.

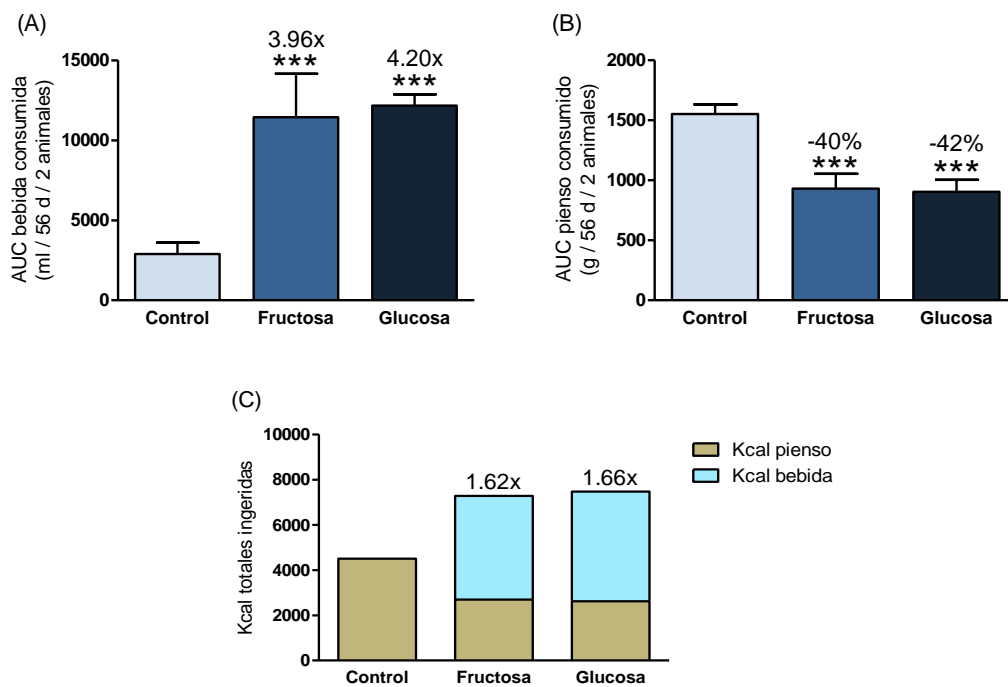


Figura V-81. Área bajo la curva (AUC) de la bebida **(A)** y del pienso **(B)** consumido por las ratas los 56 días del estudio, así como valores de consumo calórico total expresado en Kcal **(C)**. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=5$ jaulas para los tres grupos experimentales. *** $p<0.001$ vs Control.

Estos datos de consumo e ingesta calórica total en el segundo estudio son prácticamente iguales a los obtenidos en el primero. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en el estudio 1, en esta ocasión el incremento en la ingesta calórica total de las ratas fructosa y glucosa no fue acompañado de un aumento en la evolución del peso a lo largo del estudio, expresado como AUC (figura V-82A). La suplementación con fructosa o glucosa no indujo tampoco un peso mayor de los animales tras 56 días (figura V-82B).

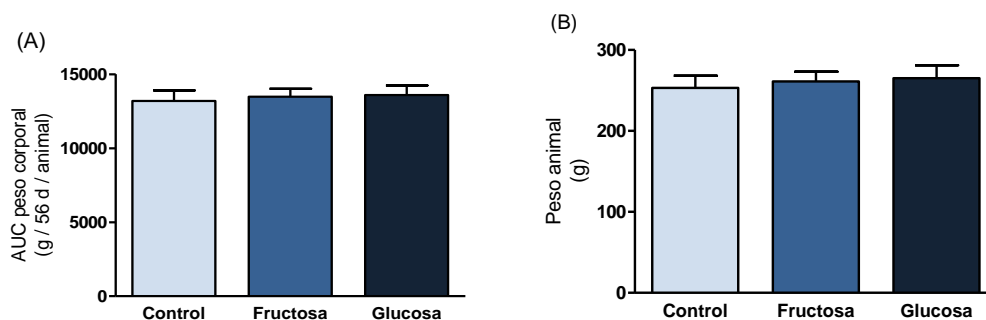


Figura V-82. Área bajo la curva (AUC) de la evolución del peso corporal a lo largo de todo el estudio (A) y peso corporal el día del sacrificio (B). Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=10$ animales para los tres grupos experimentales.

6.2) Tanto el consumo de fructosa como el de glucosa inducen hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia, pero únicamente el primero afecta a la curva de glucemia tras un test de tolerancia a la glucosa

Se analizaron los valores plasmáticos de glucosa y triglicéridos en los tres grupos de estudio y se observó cómo los niveles de glucosa no variaron en ningún grupo (figura V-83A), mientras que las ratas suplementadas con fructosa o glucosa presentaban hipertrigliceridemia (figura V-83B), en comparación con las ratas control.

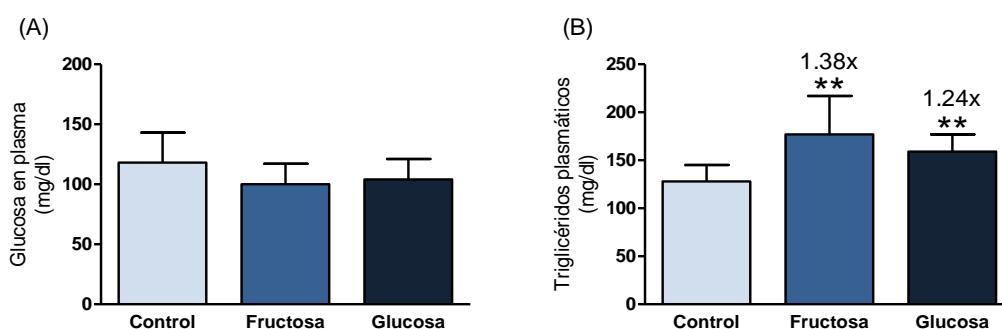


Figura V-83. Niveles plasmáticos de glucosa (A) y triglicéridos (B) tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=10$ animales para los tres grupos experimentales. ** $p<0.01$ vs Control.

También se determinaron los niveles plasmáticos de algunas hormonas de interés, como insulina, adiponectina y FGF21. Se observó que las suplementaciones con fructosa y glucosa eran capaces de inducir un estado de hiperinsulinemia (figura V-84A), mientras que los niveles de adiponectina y FGF21 no se alteraron con la ingesta de ninguno de los dos carbohidratos (figura V-84B y figura V-84C, respectivamente).

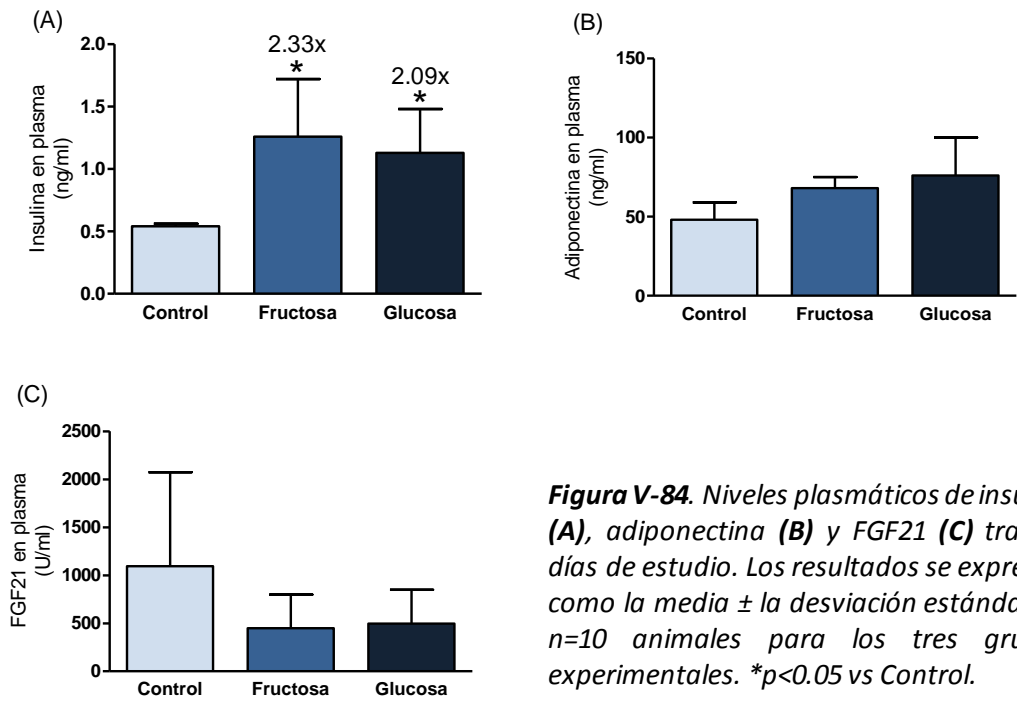


Figura V-84. Niveles plasmáticos de insulina (A), adiponectina (B) y FGF21 (C) tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=10$ animales para los tres grupos experimentales. * $p<0.05$ vs Control.

En el test de tolerancia a la glucosa (TTG) se observó cómo únicamente el grupo de ratas que habían ingerido fructosa los 56 días de estudio, presentaba unos niveles elevados de la glucemia a lo largo del test (figura V-85A). Como consecuencia de ello, el área bajo la curva (AUC) de las concentraciones de glucosa determinadas en el test de tolerancia a la glucosa, resultaron modificados únicamente en el grupo fructosa, con un incremento del 30% (figura V-85B).

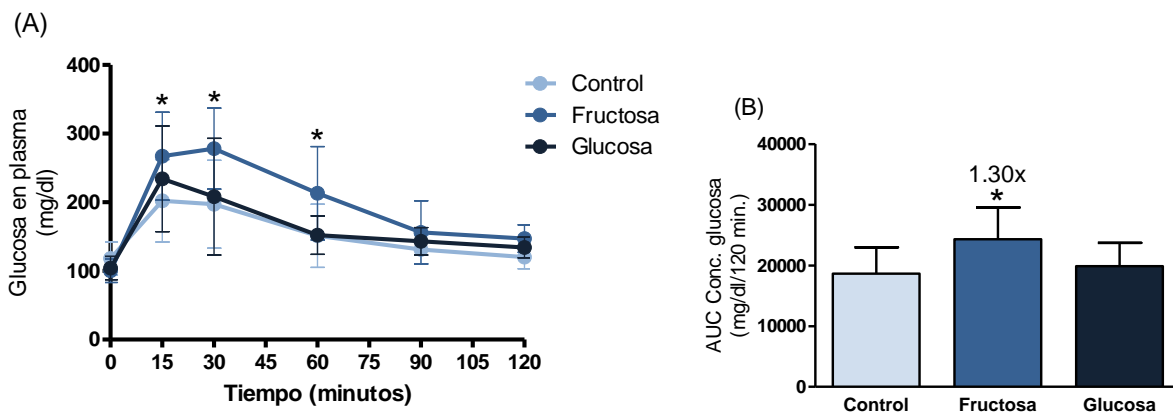


Figura V-85. Concentraciones de glucosa en plasma determinadas a diferentes tiempos después de la administración de una solución de glucosa (2g/Kg peso corporal) por vía intraperitoneal (A) y área bajo la curva (AUC) de las mismas (B). Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=10$ animales para los tres grupos experimentales. * $p<0.05$ vs Control

Además, en este mismo test, se analizó la curva de insulina y se observó cómo los niveles de esta hormona en plasma tras una administración aguda de glucosa se encontraban significativamente incrementados en los grupos suplementados con fructosa y también con glucosa a lo largo del test (figura V-86A). Como consecuencia de ello, el área bajo la curva (AUC) de las concentraciones de insulina determinadas en el test de tolerancia a la glucosa resultó aumentada en ambos grupos (figura V-86B).

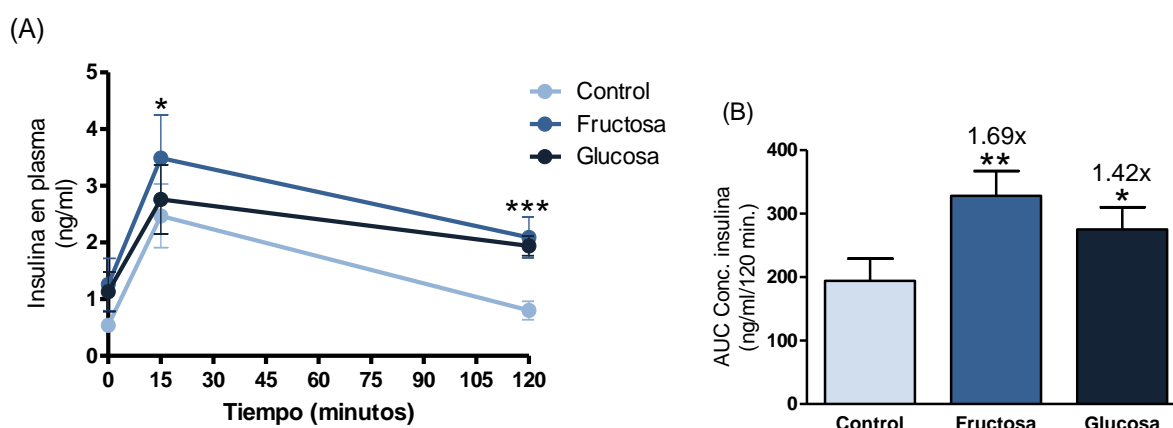


Figura V-86. Concentraciones de glucosa en sangre determinadas a diferentes tiempos después de la administración de una solución de glucosa (2g/Kg peso corporal) por vía intraperitoneal (A) y área bajo la curva (AUC) de las mismas (B). Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=10$ animales para los tres grupos experimentales. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$ vs Control.

Estos datos sugieren que las ratas suplementadas con cualquiera de los dos carbohidratos responden a una administración aguda de glucosa con una hiperinsulinemia. Sin embargo, en el caso del grupo glucosa, estas concentraciones elevadas de insulina son suficientes como para mantener unos niveles normales de glucosa en plasma; fenómeno que no ocurre en el grupo fructosa, en el que a pesar de la hiperinsulinemia, se mantiene la hiperglucemia.

Llegados a este punto, y considerando estos resultados del test de tolerancia a la glucosa, se decidió analizar con detalle la vía de señalización de la insulina en los tres principales órganos sensibles a esta hormona: hígado, tejido muscular esquelético y tejido adiposo. Para ello, se realizaron distintos análisis para comparar los niveles de los diferentes marcadores característicos de esta vía. Además, mediante el estudio de las ratas administradas con insulina intraperitoneal, se analizaron las posibles alteraciones que pudiesen existir en la activación (debida a fosforilación) de estos marcadores en los diferentes grupos experimentales.

6.3) El consumo de fructosa, pero no el de glucosa, inhibe la vía de señalización de insulina en el hígado

Se analizaron con detalle los posibles efectos que una ingesta de fructosa o de glucosa podría producir sobre la vía de señalización de la insulina a nivel hepático. Uno de los primeros parámetros a analizar fue la expresión de la proteína IRS2, la cual ya se vio disminuida tras una ingesta de fructosa en el estudio 1. Así, mediante la técnica de Western Blot, se observó cómo únicamente la ingesta de fructosa inducía un descenso en los niveles totales de la proteína IRS2 en el hígado de aquellos animales a los que no se les había administrado insulina intraperitoneal (figura V-87).

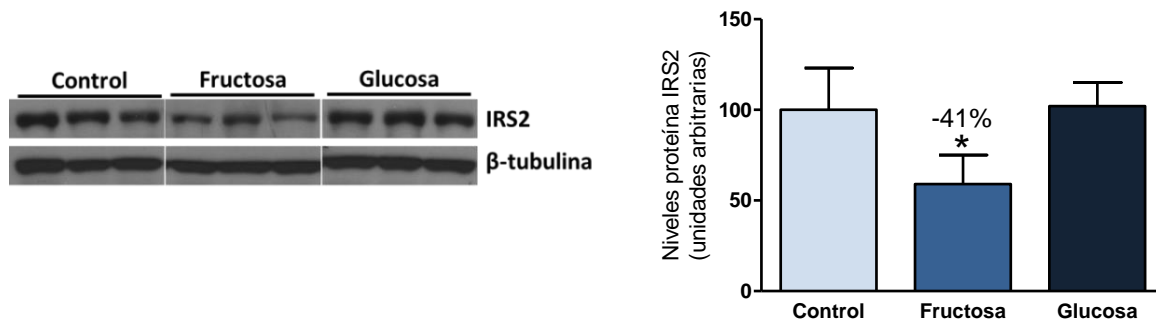


Figura V-87. Niveles de la proteína IRS determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de proteína β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=4$ animales para los tres grupos experimentales. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. * $p<0.05$ vs Control.

Teniendo en cuenta esta reducción en los niveles de IRS2 en el hígado de las ratas fructosa, se analizó la fosforilación de Akt en Ser⁴⁷³ tras una estimulación con insulina exógena. Se observó cómo las ratas suplementadas con fructosa presentaban unos valores menores de fosforilación (y por lo tanto de activación) de Akt en hígado tras un estímulo con insulina (figura V-88). Tras el análisis del grado de fosforilación en Ser⁴⁷³, se comprobó cómo únicamente en el grupo fructosa no se producía un aumento significativo del mismo (figura V-89).

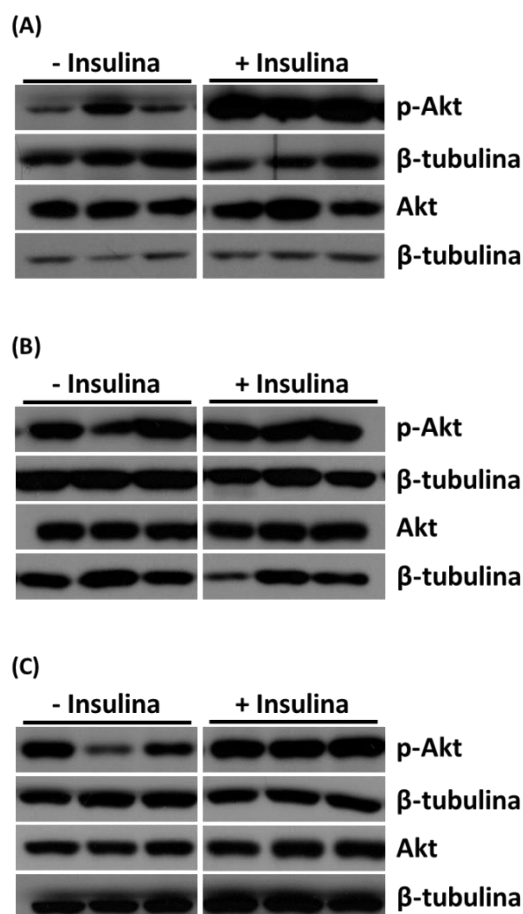


Figura V-88. Imágenes representativas del ensayo de Western Blot para la detección de los niveles de Akt total y Akt fosforilado en Ser⁴⁷³ en el grupo control (A), en el grupo fructosa (B) y en el grupo glucosa (C), determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio, antes y después de una estimulación con insulina (0.5 UI/g).

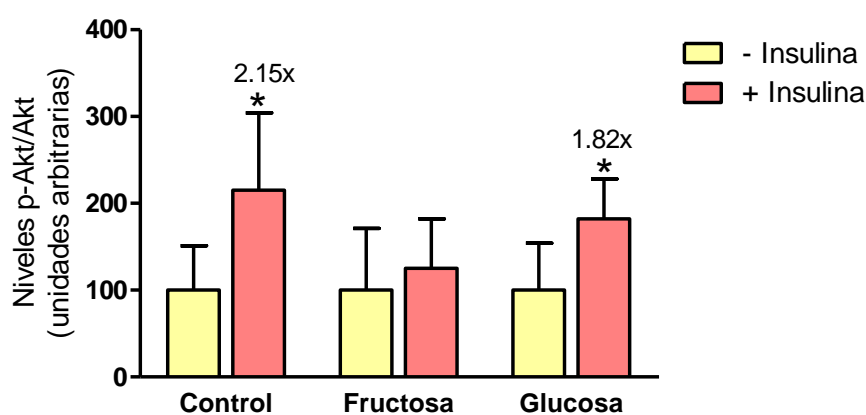


Figura V-89. Niveles de la relación p-Akt/Akt, antes y después de una estimulación con insulina (0.5UI/g), determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio, normalizados con los niveles de β -tubulina y representados en la figura V-88. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de n=4 animales para la condición "- Insulina" y n=6 animales para la condición "+ Insulina". *p<0.05 vs "- Insulina".

A pesar de la hiperinsulinemia presente en los grupos suplementados con fructosa y glucosa, los niveles de fosforilación de Akt en el hígado de estas ratas no resultaron incrementados (figura V-90). Sin embargo, el grado de fosforilación de FoxO1 en Ser²⁵⁶ se encontró significativamente aumentado en ambos grupos (figura V-91).

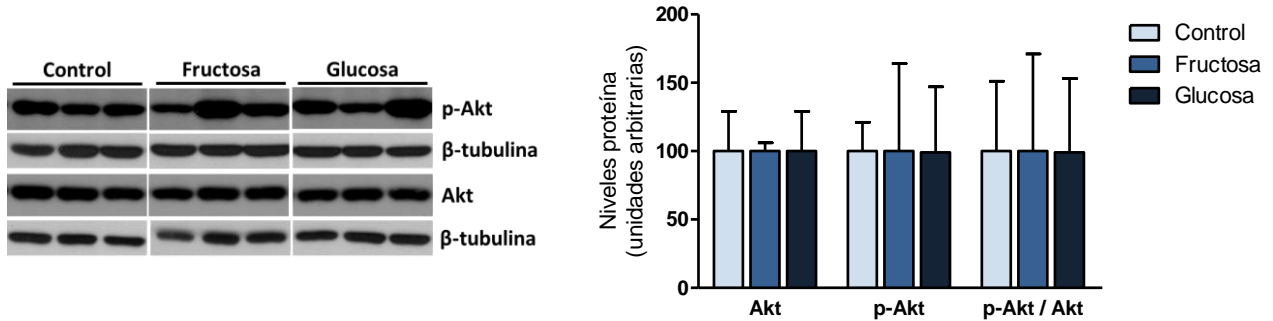


Figura V-90. Niveles de la proteína Akt, tanto en su forma fosforilada en residuo Ser⁴⁷³ como en su forma total, así como la relación Akt fosforilada con respecto a Akt total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. Tanto la forma fosforilada como la forma total se normalizaron con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=4$ animales para los tres grupos experimentales. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

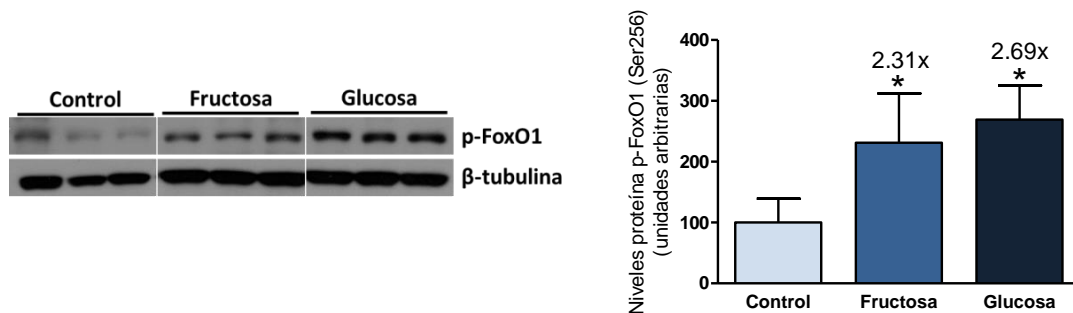


Figura V-91. Grado de fosforilación de la proteína FoxO1 en su residuo Ser²⁵⁶ determinado en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=4$ animales para los tres grupos experimentales. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. * <0.05 vs Control.

Debido a este aumento en el grado de fosforilación de FoxO1, la expresión de los principales genes gluconeogénicos, glucosa-6-fosfatasa (*g6pc*) y fosfoenol piruvato carboxicina (PEPCK), no estaba incrementada en las ratas suplementadas con fructosa y glucosa. De hecho, en el hígado de las ratas que habían ingerido fructosa, los niveles del gen *g6pc* se encontraron significativamente reducidos (0.7 *fold-change*, $p<0.05$). Estos datos sugieren que la hiperglucemia observada durante el test de tolerancia a la glucosa en las ratas suplementadas con fructosa, no puede explicarse mediante un aumento de la síntesis de glucosa hepática.

Tal y como ocurría en el estudio 1, nos encontramos con un fenómeno de fosforilación de FoxO1 no dependiente de la vía insulina/Akt. Se inició una búsqueda para determinar qué proteína podría estar produciendo esta inactivación por fosforilación de FoxO1. Así, se analizaron algunas de las proteínas reguladoras de la actividad de FoxO1 ya estudiadas en las ratas del estudio 1.

Una de estas proteínas analizadas fue la fosfatasa MKP-3. A pesar de que en el estudio 1 los niveles de esta proteína se encontrasen disminuidos en el hígado de las ratas suplementadas con fructosa, en este nuevo estudio las ratas fructosa presentaban los mismos niveles de MKP-3 que las ratas del grupo control y del grupo glucosa (figura V-92).

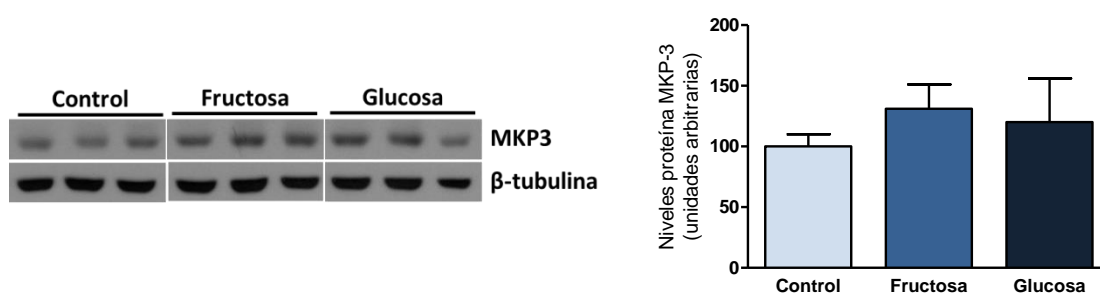


Figura V-92. Niveles de la proteína MKP-3 determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=4$ animales para los tres grupos experimentales. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Otra cinasa capaz de activar a FoxO1, y también analizada en el estudio 1, es SGK. Se estudió el grado de fosforilación de Ser⁴²², dependiente de mTORC2, y se observó cómo en este estudio, a diferencia de lo que ocurría en el estudio 1, la suplementación con fructosa no incrementaba la fosforilación hepática en este residuo de SGK, algo que tampoco ocurría cuando el azúcar añadido en la bebida era la glucosa (figura V-93).

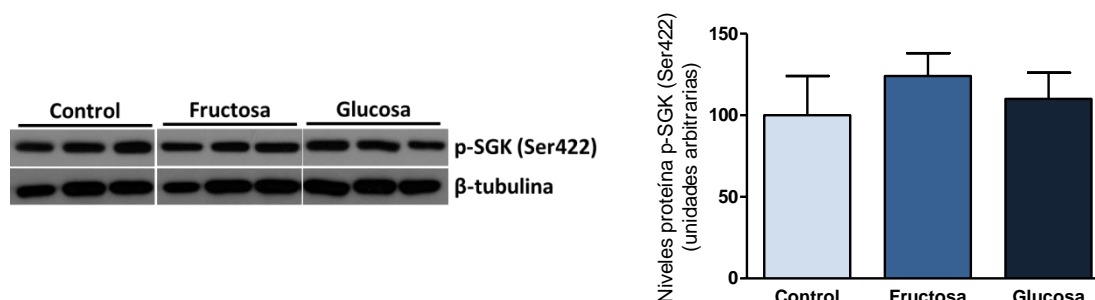


Figura V-93. Grado de fosforilación de la proteína SGK en su residuo Ser⁴²² determinado en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=4$ para los tres grupos experimentales. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Otra cinasa analizada en el estudio 1 y con capacidad de regular FoxO1 es Erk. Se estudió el grado de fosforilación de esta cinasa en su residuo Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ y se observó cómo no existía alteración del mismo en ninguno de los dos grupos a los que se les suplementó la dieta con algún carbohidrato (figura V-94).

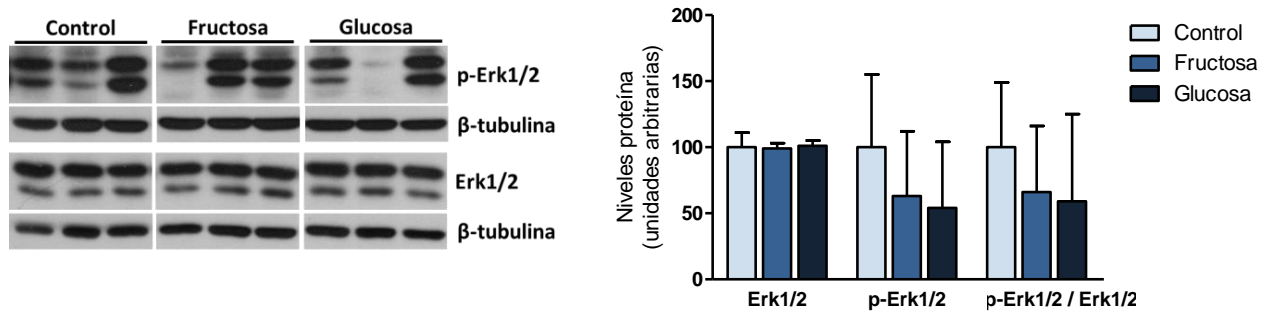


Figura V-94. Niveles de la proteína Erk1/2, tanto en su forma fosforilada en residuo Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ como en su forma total, así como la relación Erk1/2 fosforilada con respecto a Erk1/2 total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. Tanto la forma fosforilada como la forma total se normalizaron con los niveles de β-tubulina. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=4 animales para los tres grupos experimentales. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Se decidió estudiar también los niveles de la cinasa PKA, capaz de regular la actividad de FoxO1 por fosforilación. De esta manera, se observó cómo una ingesta de fructosa o de glucosa durante 56 días no era suficiente como para inducir en hígado un aumento en la fosforilación (y por tanto, en la activación) de esta cinasa, en comparación con las ratas del grupo control (figura V-95).

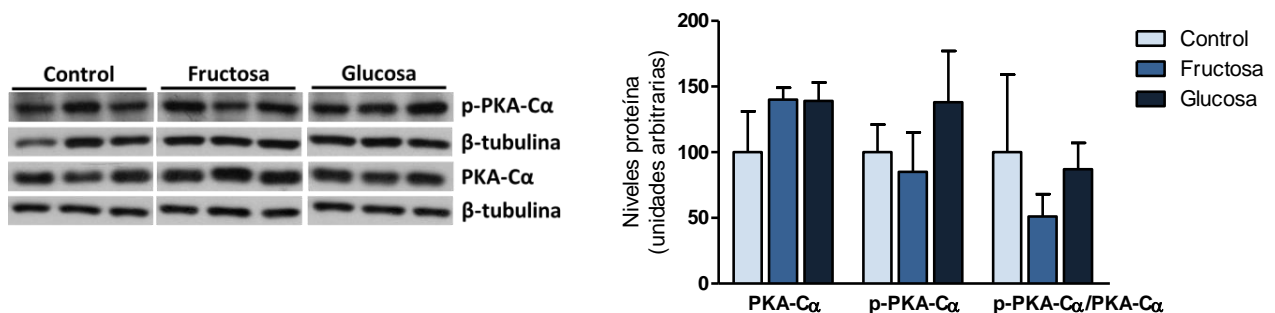


Figura V-95. Niveles de la proteína PKA-Cα, tanto en su forma fosforilada en residuo Thr¹⁹⁷ como en su forma total, así como la relación PKA-Cα fosforilada con respecto a PKA-Cα total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. Tanto la forma fosforilada como la forma total, se normalizaron con los niveles de β-tubulina. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=4 animales para los tres grupos experimentales. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Otra cinasa capaz de regular la homeostasis de la glucosa en hígado es la proteína SIK2 (*salt-inducible kinase2*), una serina/treonina cinasa que actúa como importante supresor gluconeogénico en el hígado. Dentin y colaboradores (2007) defienden que en estado postabsortivo, una elevada concentración de insulina plasmática es capaz de inhibir genes gluconeogénicos mediante la inducción de SIK2. Además, Horike y colaboradores (2003) sugieren que una alta expresión de esta cinasa es capaz de fosforilar residuos serina inhibitorios en la proteína IRS1, provocando así resistencia a la insulina. SIK2 es una cinasa capaz de activarse por la cantidad de solutos ingeridos por el animal. Dado que las ratas de los grupos fructosa y glucosa habían ingerido 4 veces más líquido que las ratas control, se planteó la posibilidad de que estos animales tuviesen una expresión más elevada de SIK2. Sin embargo, se observó que los niveles de proteína total de esta cinasa no se encontraban alterados en ninguno de grupos suplementados con fructosa o glucosa (figura V-96).

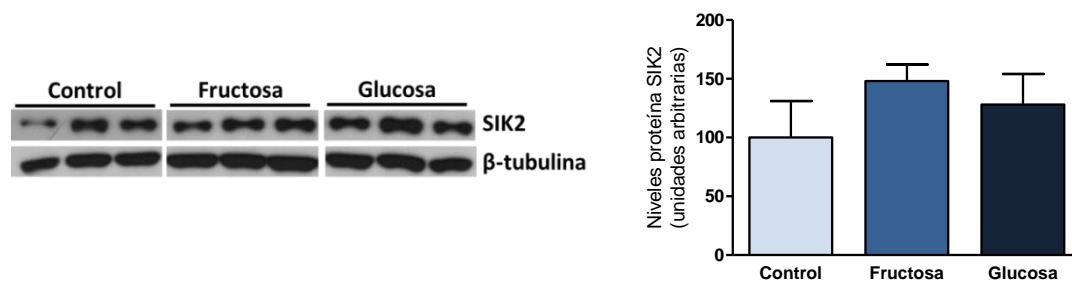


Figura V-96. Niveles de la proteína SIK2 determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio normalizados con los niveles de β -tubulina. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=4$ animales para los tres grupos experimentales. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Por último, se valoró el grado de fosforilación de mTOR, ya que recientemente se ha descrito que esta proteína también puede regular directamente a FoxO1 mediante su fosforilación (Yue y col., 2015). Se observó cómo en los grupos fructosa y glucosa, que presentaban unos niveles elevados de fosforilación en FoxO1 (tal y como se indica en la figura V-91), los niveles de fosforilación de mTOR en Ser²⁴⁸¹ eran también superiores en comparación con el grupo control (figura V-97).

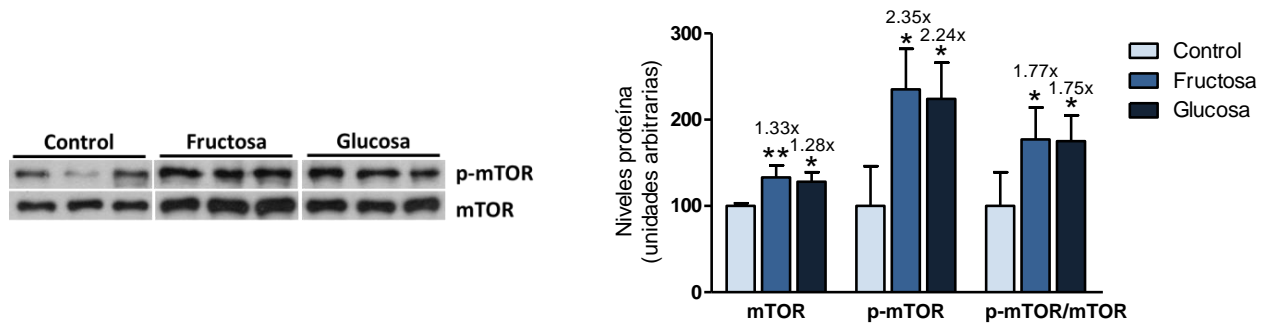


Figura V-97. Niveles de la proteína mTOR, tanto en su forma fosforilada en residuo Ser²⁴⁸¹ como en su forma total, así como la relación mTOR fosforilada con respecto a mTOR total, determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. La uniformidad de carga se comprobó por tinción de las membranas con Roig Ponceau. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=4 animales para los tres grupos experimentales. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot. *p<0.05 y **p<0.01 vs Control.

Para confirmar esta fosforilación de mTOR, que implica la activación de esta proteína, se estudió el grado de fosforilación de la proteína inhibitoria de la actividad de mTOR, TSC2, en su residuo Thr¹⁴⁶², que provoca la inactivación de esta proteína que forma parte del complejo TSC1/2. De esta manera, un aumento en el grado de fosforilación de este residuo comporta un aumento en la actividad de mTOR. Se observó que las ratas que presentaban mayor actividad de mTOR (grupos fructosa y glucosa) presentaban también mayor fosforilación de TSC2 (figura V-98).

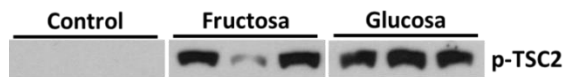


Figura V-98. Imagen representativa del ensayo de Western Blot para la detección de los niveles de TSC2 fosforilado en Thr¹⁴⁶² determinados en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio. La uniformidad de carga se comprobó por tinción de las membranas con Roig Ponceau.

6.4) El consumo de fructosa, pero no el de glucosa, disminuye la fosforilación de AS160 en el tejido muscular esquelético

Tal y como se realizó en las muestras de hígado, se llevó a cabo un análisis de la vía de señalización de la insulina en el tejido muscular esquelético. Se analizó la fosforilación de Akt en Ser⁴⁷³ tras una estimulación con insulina exógena y se observó que en este tejido los tres grupos presentaban una respuesta equiparable de activación de Akt (figura V-99).

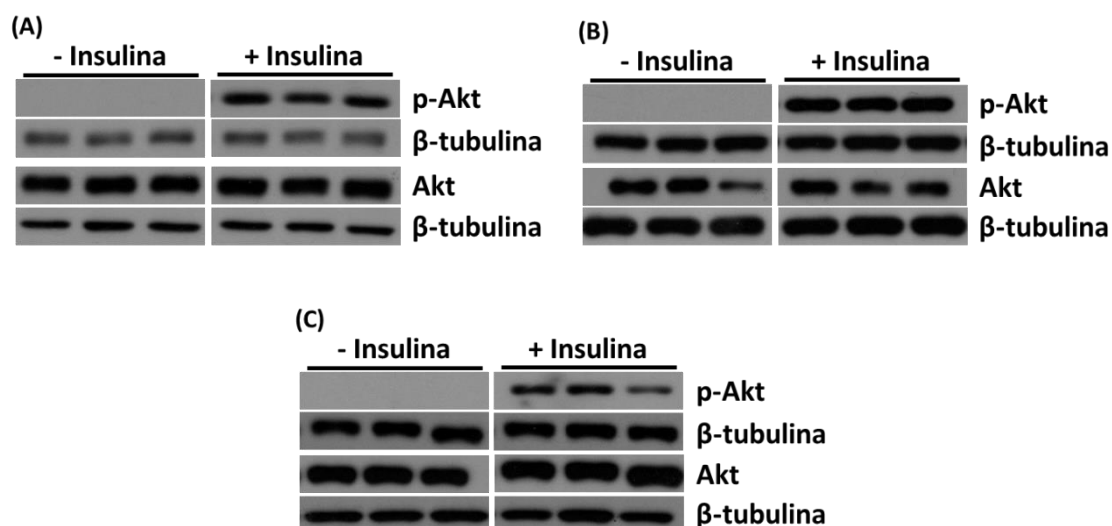


Figura V-99. Imágenes representativas del ensayo de Western Blot para la detección de los niveles de Akt total y Akt fosforilado en Ser⁴⁷³ en el grupo control (A), en el grupo fructosa (B) y en el grupo glucosa (C), determinados en muestras de tejido muscular esquelético de proteína total de rata tras 56 días de estudio, antes y después de una estimulación con insulina (0.5 UI/g).

Se determinó el grado de fosforilación de AS160, proteína diana de la cinasa Akt, en su residuo Thr⁶⁴². Se observó que, a pesar de que los tres grupos presentaban una respuesta similar de activación de Akt tras un estímulo exógeno de insulina, el grupo fructosa presentó un grado de fosforilación de AS160 menor, con respecto a los otros dos grupos (figura V-100), lo que podría indicar que en el grupo fructosa existe algún impedimento en la fosforilación de AS160, que podría reducir la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y, por tanto, hacer que el músculo esquelético de las ratas de este grupo capten menos glucosa plasmática.

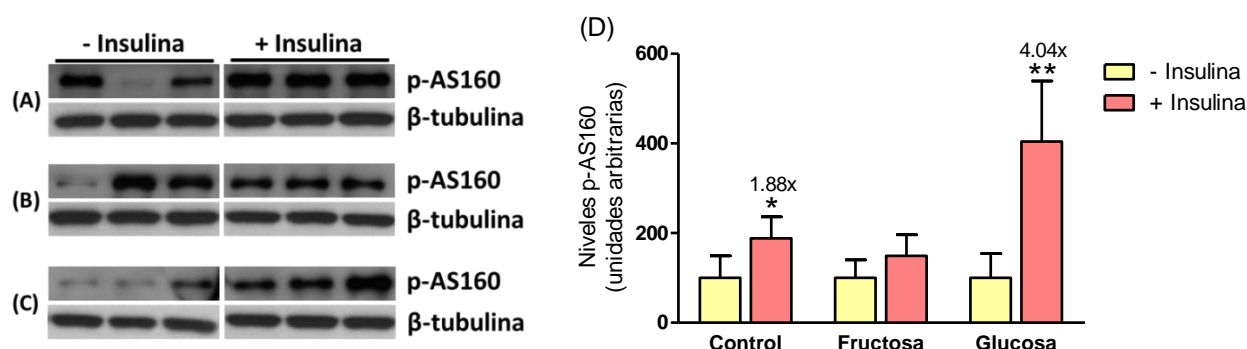


Figura V-100. Imágenes representativas del ensayo de Western Blot para la detección de los niveles de AS160 fosforilado en Thr⁶⁴² antes y después de una estimulación con insulina (0.5UI/g), en el grupo control (A), en el grupo fructosa (B) y en el grupo glucosa (C) determinados en muestras de tejido muscular esquelético de proteína total de rata tras 56 días de estudio. Niveles de p-AS160 normalizados con los niveles de β -tubulina y representados en la figura de la izquierda. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=4$ animales para la condición "- Insulina" y $n=6$ para la condición "+ Insulina" (D). * $p<0.05$ y ** $p<0.01$ vs "- Insulina".

En situación basal (es decir, sin estimulación exógena de insulina), las ratas del grupo fructosa, al igual que ocurría con las ratas del grupo glucosa, presentaban un grado menor de fosforilación de AS160, en comparación con las ratas del grupo control (figura V-101).

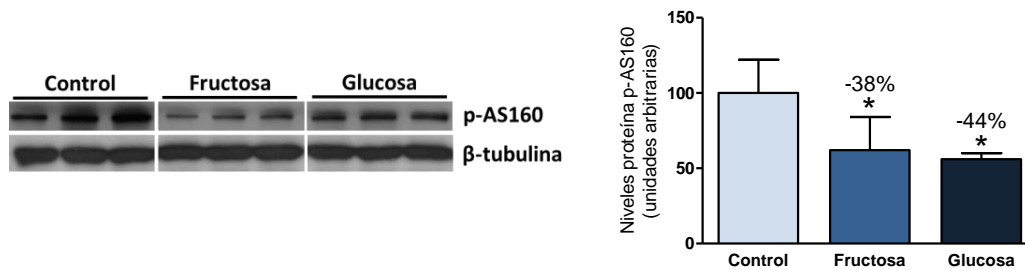


Figura V-101. Grado de fosforilación de la proteína AS160 en su residuo Thr⁶⁴² determinado en muestras hepáticas de proteína total de rata tras 56 días de estudio y normalizados con los niveles de β-tubulina. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=4 animales para los tres grupos experimentales. En la parte izquierda se muestran imágenes representativas del correspondiente ensayo de Western Blot.

Se analizaron los niveles de GLUT4 en tejido muscular, tanto a nivel de proteína como a nivel de mRNA. En ninguno de los dos casos, la suplementación con fructosa o glucosa indujo cambios en comparación con las ratas del grupo control.

Se analizaron también los niveles de expresión de genes implicados en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, y que se vieron modificados tras una ingesta de fructosa en los animales del estudio 1, como es el caso de los genes *pgc1α* y *gpr119*. Sin embargo, en este nuevo estudio no se reprodujeron los resultados obtenidos en el primer estudio y la suplementación con glucosa tampoco indujo cambios en la expresión de estos genes (figura V-102A). Además, en tejido muscular también se analizó la expresión de los genes que codifican para las proteínas DGAT1 (diacilglicerol acil-transferasa) y mt-co1 (subunidad 1 de la citocromo C oxidasa). El primero de ellos se relaciona con desarrollo de resistencia a la insulina en músculo, mientras que mt-co1 se trata de un marcador mitocondrial, y se ha descrito cómo una disfunción mitocondrial puede estar implicada en la resistencia a la insulina en músculo. En el presente estudio, no se observaron cambios en la expresión de estos genes en los grupos fructosa y glucosa, en comparación con las ratas control (figura V-102B).

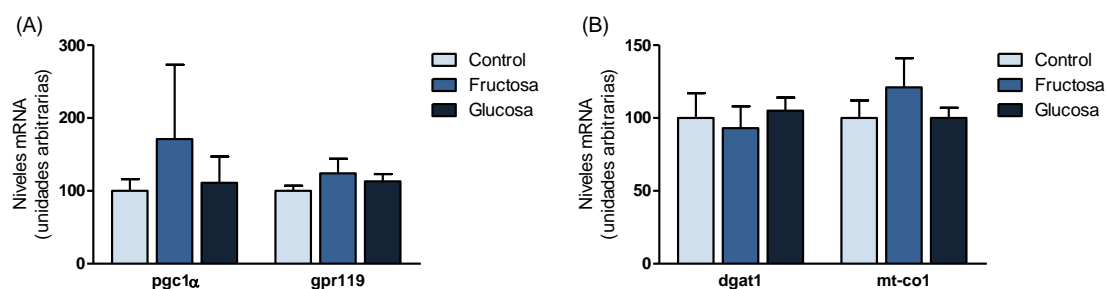


Figura V-102. Niveles de expresión de los genes *pgc1α* y *gpr119* (A), así como de *dgat1* y *scd1* (B), normalizados con los niveles de *tbp* en muestras de hígado de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=4$ animales para los tres grupos experimentales.

6.4.1) Efecto del tratamiento con fructosa en células C₂C₁₂

Se realizó un estudio con una línea celular de mioblastos de ratón, con el objetivo de reproducir *in vitro* los resultados obtenidos *in vivo* con los animales de experimentación. Para ello, se realizó un primer cultivo de células C₂C₁₂, las cuales fueron tratadas 48 horas con una concentración de fructosa 25 mM disuelta en el medio. 10 minutos antes de la obtención del extracto proteico total, estas células fueron estimuladas con insulina, a una concentración de 1 mM, 10 nM, o 100 nM.

Se analizó el grado de fosforilación de Akt en Ser⁴⁷³ tras esta estimulación con insulina, con el objetivo de analizar si en las células tratadas con fructosa 25 mM dicha fosforilación se encontraba reducida con respecto a las células control, lo que sería indicativo de un déficit en la vía de señalización por esta hormona. Sin embargo, tal y como ocurría con en el tejido muscular esquelético, la estimulación con insulina (en cualquiera de sus tres concentraciones) señaló con la misma intensidad en las células de los dos grupos (figura V-103). Estos datos descartan un efecto adverso de la fructosa sobre la vía de señalización de insulina y mediada por Akt, en cultivo de células musculares C₂C₁₂.

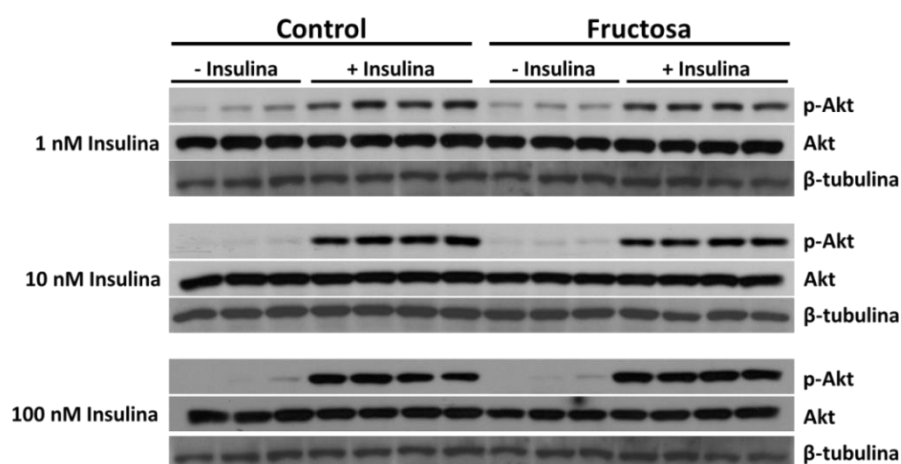


Figura V-103. Imágenes representativas del ensayo de Western Blot para la detección de los niveles de Akt total y Akt fosforilado en Ser⁴⁷³, antes y después de una estimulación con insulina, determinados en muestras de proteína total de células C₂C₁₂.

En este cultivo celular se analizó también la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la captación y el metabolismo de la fructosa, así como con la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos en el tejido muscular esquelético. Es el caso del transportador GLUT5, fructocinasa (FK) y la proteína GPR119. Sin embargo, se observó que un tratamiento de 48 horas con fructosa 25 mM no inducía cambios en la expresión de estos marcadores, en comparación con las células control (figura V-104).

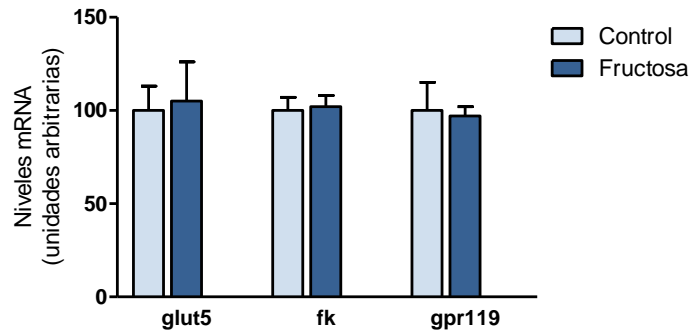


Figura V-104. Niveles de expresión de los genes *glut5*, *fk* y *gpr119* normalizados con los niveles de *aprt* en muestras de células C_2C_{12} . Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=6$ réplicas para los dos grupos experimentales.

Una vez analizado el nulo efecto de un tratamiento con fructosa en estas células, se decidió realizar un nuevo cultivo celular, pero esta vez se sustituyendo el medio de tratamiento por un medio sin glucosa. De esta manera, las células del grupo fructosa únicamente disponían de este carbohidrato como fuente de energía en el medio. El tiempo de tratamiento en este cultivo fue menor que en el anterior (6 horas) y la concentración de insulina utilizada para estimular a las células fue de 100 nM.

Se analizó el grado de fosforilación de Akt en Ser⁴⁷³ y, tal y como ocurría en el primer cultivo, el tratamiento con fructosa 25 mM no provocó una disminución en la fosforilación (y activación) de la vía de señalización de la insulina (figura V-105).

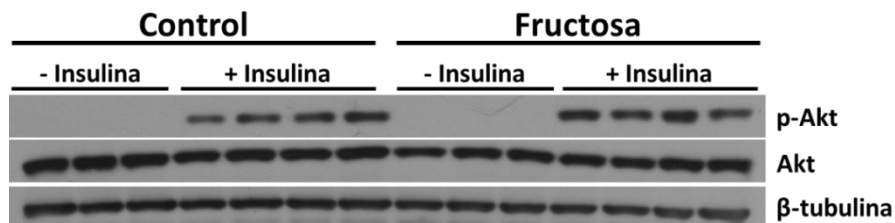


Figura V-105. Imágenes representativas del ensayo de Western Blot para la detección de los niveles de Akt total y Akt fosforilado en Ser⁴⁷³, antes y después de una estimulación con 100 nM de insulina, determinados en muestras de proteína total de células C_2C_{12} .

6.5) El consumo de fructosa, pero no el de glucosa, inhibe la vía de señalización de insulina y disminuye la lipólisis en el tejido adiposo

Tal y como se hizo en hígado y en tejido muscular esquelético, se analizó también en tejido adiposo la fosforilación de Akt en Ser⁴⁷³ tras una estimulación con insulina exógena, con el objetivo de analizar si dicha fosforilación se encontraba alterada con respecto a las ratas del grupo control. Así, se observó cómo las ratas suplementadas con fructosa y glucosa presentaban unos valores menores de fosforilación (y por lo tanto de activación) de Akt en este tejido tras un estímulo con insulina (figura V-106). Sin embargo, tras el análisis del grado de fosforilación en Ser⁴⁷³, se observó cómo únicamente en el grupo fructosa no se producía un aumento significativo del mismo tras este estímulo de insulina (figura V-107).

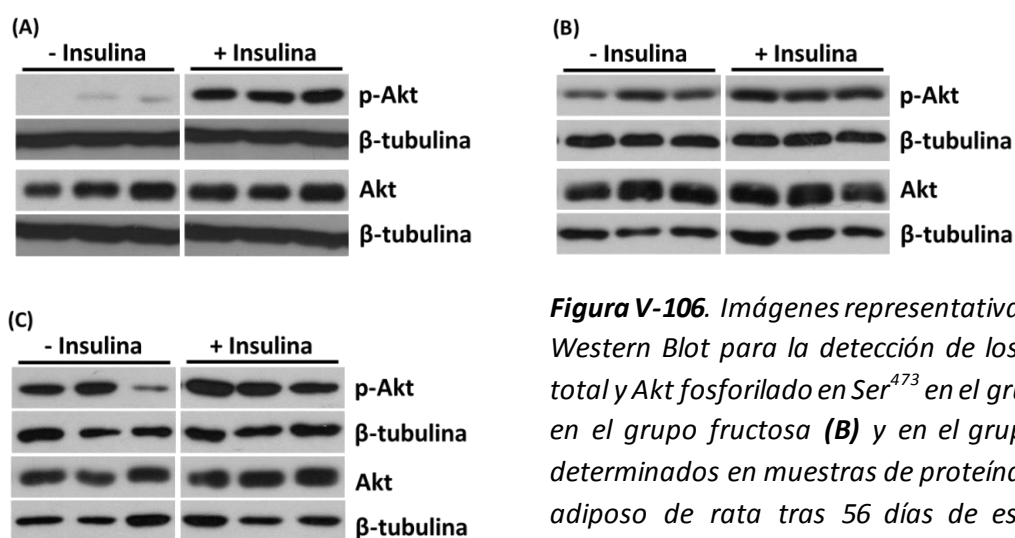


Figura V-106. Imágenes representativas del ensayo de Western Blot para la detección de los niveles de Akt total y Akt fosforilado en Ser⁴⁷³ en el grupo control (A), en el grupo fructosa (B) y en el grupo glucosa (C), determinados en muestras de proteína total de tejido adiposo de rata tras 56 días de estudio, antes y después de una estimulación con insulina (0.5 UI/g).

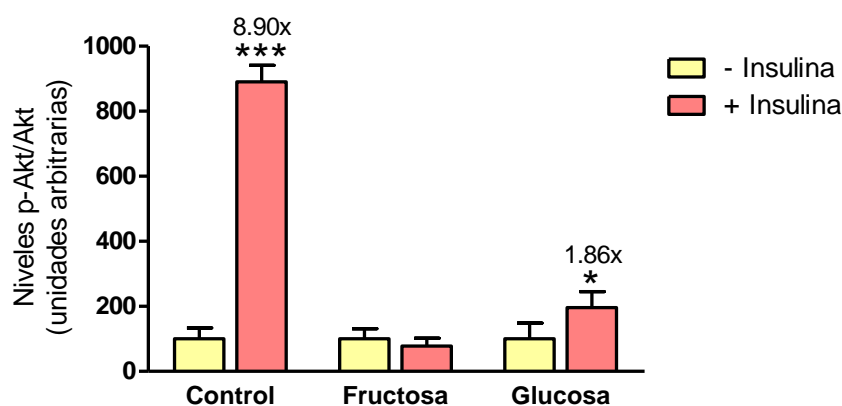


Figura V-107. Niveles de la relación p-Akt/Akt, antes y después de una estimulación con insulina (0.5UI/g) determinados en muestras de proteína total de tejido adiposo de rata tras 56 días de estudio, normalizados con los niveles de β-tubulina y representados en la figura V-106. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de n=4 animales para la condición “- Insulina” y n=6 animales para la condición “+ Insulina”. *p<0.05 y ***p<0.001 vs “- Insulina”.

Tras el estudio de esta ausencia en la fosforilación de Akt del grupo fructosa después de un estímulo de insulina exógena, se analizaron los niveles de ácidos grasos libres o no esterificados (NEFAs) en el plasma de los animales del estudio 2. La principal función de la insulina en el tejido adiposo es la de inhibir la lipólisis, por lo que una alteración en la transducción de la señal de esta hormona, se traducirá en una modificación de los niveles de los NEFAs (producto de la lipólisis) circulantes en plasma.

Efectivamente, se observó cómo las ratas suplementadas con fructosa presentaban una mayor concentración de NEFAs en plasma tras esta estimulación (figura V-108), lo que confirma una alteración en la vía de señalización de insulina únicamente en ratas que habían ingerido fructosa.

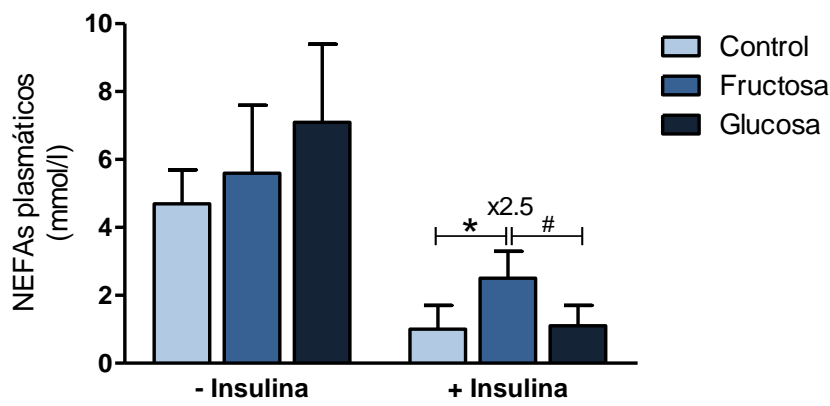


Figura V-108. Niveles de NEFAs, antes y después de una estimulación con insulina (0.5UI/g), determinados en muestras de plasma de rata tras 56 días de estudio. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de $n=4$ animales para la condición “- Insulina” y $n=6$ animales para la condición “+ Insulina”. * $p<0.05$ vs Control y # $p<0.05$ vs Fructosa.

VI. DISCUSIÓN

En las últimas décadas, se ha observado un incremento notable de la prevalencia de alteraciones metabólicas como la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes mellitus de tipo 2. El estilo de vida de las personas juega un papel importante en la aparición de estas alteraciones, así como hábitos alimenticios poco saludables.

En los últimos 30 años no sólo se ha producido un aumento de la ingesta calórica total, sino que también ha tenido lugar un cambio en la proporción en la que algunos nutrientes forman parte de la dieta humana (Elliot y col., 2002), con un marcado aumento de la ingesta de azúcares procedentes, sobretudo, de bebidas edulcoradas (Johson, Appel y col., 2009; Malik y col., 2010). Estos azúcares, ya sean en forma de sacarosa o de jarabe de maíz enriquecido con fructosa (HFCS), aportan al organismo una cantidad importante de fructosa, la cual, debido a sus particularidades metabólicas, puede influir de forma negativa en la homeostasis energética del mismo. En este sentido, en los últimos años se han publicado numerosos estudios que relacionan el consumo de fructosa con un aumento en la concentración de glucosa plasmática, dislipemia, acumulación ectópica de lípidos y resistencia a la insulina (Elliot y col., 2002; Havel, 2005; Stanhope y col., 2009; Tappy y Lê, 2010).

La rata suplementada con fructosa es el modelo experimental más utilizado a la hora de analizar los mecanismos por los cuales la fructosa provoca alteraciones metabólicas. Esto es debido a que la rata, tal y como ocurre en los humanos, es incapaz de transformar la fructosa ingerida en la dieta en glucosa, ya que este animal carece del enzima glucosa-6-fosfatasa a nivel intestinal (Mayes, 1993). Además, la administración de fructosa en ratas produce unos desequilibrios metabólicos semejantes a los que sufren los humanos con síndrome metabólico (Nagai y col., 2002). Aquellas dietas que incorporan un 10% (p/v) de fructosa en el agua de bebida mimetizan el patrón de consumo en humanos y permite una ingesta de fructosa diaria equivalente a la que se encuentra en el cuartil superior de la población (Alegret y col., 2011). Por este motivo, nuestro grupo de investigación escogió la rata Sprague-Dawley con una dieta suplementada con un 10% (p/v) de fructosa en el agua de bebida como modelo para el estudio de las alteraciones metabólicas que causa el consumo de fructosa. Así, se determinó cómo la ingesta de este azúcar inducía hipertrigliceridemia y esteatosis hepática, fenómenos que no ocurrían cuando la dieta se suplementaba con glucosa (Roglans y col., 2007). Además, se observó una diferencia entre géneros como resultado de un consumo de fructosa, ya que las ratas hembra presentaron una afectación mayor del metabolismo de carbohidratos y lípidos con respecto a las ratas macho (Vilà y col., 2011). Se demostró también cómo el efecto adverso de la fructosa sobre el metabolismo lipídico y de carbohidratos era debido a la suma de dos factores: incremento de la síntesis hepática de ácidos grasos y disminución de la oxidación de los mismos por parte del hígado (Roglans y col., 2007; Rebollo y col., 2014b). Se determinó que las alteraciones producidas por la fructosa en la homeostasis hepática de la glucosa eran debidas a una reducción de los niveles la proteína IRS2 (*insulin receptor substrate 2*), que juega un papel importante en la vía de señalización de la insulina y cuyo déficit se ha relacionado con fenómenos de resistencia a la insulina (Rebollo y col., 2014a).

Hasta la fecha, en nuestro grupo de investigación siempre se había trabajado con un tiempo de suplementación de 14 días, lo que equivale a una suplementación semiaguda. Sin embargo, para el presente trabajo se decidió ampliar el tiempo de suplementación de este azúcar hasta los 56 días, periodo que corresponde a una suplementación subcrónica. De esta manera, se estudiaron con detenimiento los mecanismos moleculares responsables de las alteraciones observadas en estudios previos, con el fin de determinar si estos cambios se mantenían con el paso del tiempo o si, por el contrario, se atenuaban o aparecían algunos nuevos. Las principales vías metabólicas de interés en este trabajo fueron las que se centran en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, así como aquellas que estudian procesos relacionados con algunas alteraciones metabólicas inducidas por la fructosa, como es el caso de la autofagia, estrés de retículo o inflamación. De manera adicional, en el presente trabajo también se realizó un estudio comparativo entre una ingesta de fructosa y una ingesta equicalórica de glucosa sobre la vía de señalización de la insulina, con el objetivo de determinar si existían diferencias entre la suplementación de los dos azúcares.

1) Efectos de la fructosa sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos

El primer objetivo de la presente tesis doctoral fue analizar las vías metabólicas de carbohidratos y lípidos tras una suplementación con fructosa al 10% (p/v) durante un periodo de 56 días. Los primeros valores analizados en estos animales fueron aquellos que hacen referencia a la ingesta calórica. La suplementación de fructosa provocó un aumento en la ingesta líquida y una disminución en la ingesta de comida, lo que implicó que las ratas del grupo fructosa ingirieran un 60% más de calorías totales con respecto a las ratas del grupo control. Como consecuencia de ello, los animales del grupo fructosa presentaron mayor peso corporal trascurridos los 56 días de estudio.

A nivel plasmático, se analizaron diferentes hormonas con efectos sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos. La primera de estas hormonas analizadas fue la adiponectina. Son varios los estudios que demuestran cómo los niveles de adiponectina en plasma se encuentran inversamente relacionados con la adiposidad, la sensibilidad a la insulina y la diabetes tipo 2. De esta manera, unas concentraciones bajas de adiponectina se asocian con un riesgo alto de sufrir enfermedades cardiovasculares (Hotta y col, 2000; Weyer y col., 2001). Sin embargo, en el presente trabajo, a pesar de que las ratas del grupo fructosa presentaban un mayor peso de tejido adiposo que las ratas control, los niveles plasmáticos de adiponectina no se vieron modificados tras la suplementación con fructosa líquida, algo que sí ocurría cuando esta suplementación era de 14 días (Rebollo y col., 2014a).

La segunda de estas hormonas analizadas fue la leptina, que al igual que la adiponectina, se sintetiza en el tejido adiposo. Estudios previos en nuestro laboratorio realizados con ratas macho mostraron un aumento de los niveles de esta hormona en plasma como resultado de una ingesta de fructosa, lo que podría determinar una situación de resistencia hepática a esta

adipocina (Roglans y col., 2007; Vilà y col., 2011). En el presente trabajo, la suplementación de 56 días en ratas hembra provocó un aumento de casi el doble en los niveles de leptina en plasma que, además, podría explicarse mediante el incremento en la expresión del gen que codifica para esta hormona en el tejido adiposo. Esta hiperleptinemia podría ser consecuencia del aumento, de también casi el doble, de los niveles de insulina en plasma en las ratas fructosa, que se explicará con más detalle a continuación. El posible efecto de esta hiperleptinemia observada en ratas del grupo fructosa podría ser el de provocar una sensación de saciedad en el animal, que explicaría así la disminución de la ingesta de comida por parte de los animales de este grupo.

Se determinaron también los niveles plasmáticos de ácido úrico y se observó cómo la ingesta de fructosa produjo un aumento del 87% en los niveles de este parámetro. Son varios los estudios que relacionan una suplementación de fructosa con una hiperuricemia (Mayes, 1993; Johnson y col., 2013), que actuaría como factor inductor de una posible hipertensión arterial. Además, se ha observado cómo en humanos y en roedores esta capacidad de producir hiperuricemia es exclusiva de la fructosa (Johnson y col., 2007). En el presente trabajo se observó cómo, efectivamente, las ratas del grupo fructosa presentaban hipertensión arterial después de 56 días de estudio (datos no mostrados). Por lo tanto, es muy importante valorar la posibilidad de que la fructosa sea la responsable de la aparición de un aumento en la presión arterial, que podría conducir a complicaciones cardiovasculares.

La suplementación de 56 días con fructosa líquida provocó en los animales del presente estudio un aumento considerable de triglicéridos en plasma y esteatosis hepática (acompañada de un incremento de peso del hígado con respecto al peso corporal), datos que coinciden con estudios anteriores en nuestro grupo de investigación (Roglans y col., 2002; Roglans y col., 2007; Vilá y col., 2008; Vilá y col., 2011; Rebollo y col., 2014b). Además, esta suplementación también indujo un aumento en el peso del tejido adiposo (expresado con respecto al peso corporal), datos que ponen de manifiesto la gran capacidad que presenta la fructosa de aumentar la síntesis de ácidos grasos en los dos tejidos con más actividad lipogénica del organismo.

Efectos de la fructosa sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos en hígado

Es ampliamente conocido que la fructosa aumenta la expresión de enzimas clave que participan en la lipogénesis hepática (Dekker y col., 2010; Lim y col., 2010; Lustig, 2010). En el presente trabajo, se observó cómo la fructosa era capaz de inducir su propio metabolismo, mediante el aumento de casi el doble de la expresión de la proteína fructocinasa (FK). Este fenómeno resultó clave para el incremento de la síntesis de lípidos en el hígado de las ratas fructosa, que se podría explicar gracias a la inducción de la expresión de enzimas que controlan la síntesis de ácidos grasos en el hígado (GAPDH, LPK, FAS, SCD1, GPAT). Este hecho ya se había observado en un estudio anterior en el cual se suplementó la dieta de ratas macho con un 10% (p/v) de fructosa o de glucosa en el agua de bebida durante 14 días (Roglans y col., 2007). Los animales

suplementados con cualquiera de los dos azúcares presentaron una inducción de los enzimas implicados en la lipogénesis hepática con respecto al grupo control, pero los fenómenos de hipertrigliceridemia y esteatosis hepática sólo tenían lugar en las ratas del grupo fructosa.

Los principales reguladores de la lipogénesis hepática en respuesta a las condiciones nutricionales son ChREBP (*carbohydrate responsive element binding protein*) y SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein-1c*) (Koo y col., 2001; Denechaud y col., 2008; Ferré y Fougère, 2010). En el presente estudio, la ingesta de fructosa incrementó más de 6 veces los niveles de la proteína ChREBP (así como la expresión de sus genes diana), pero no modificó los niveles de la forma madura de SREBP-1c, ni de su gen diana glucocinasa (GK) en hígado. Estos datos sugieren que la inducción de la lipogénesis es independiente de SREBP-1c y se ve favorecida por la activación de ChREBP en respuesta a un consumo de fructosa. Estas observaciones contrastan con el estudio de Koo y colaboradores (2009), que determinaron un aumento en la expresión de SREBP-1c hepático frente a una administración de una dieta rica en fructosa. Sin embargo, en dicho estudio la fructosa utilizada procedía de una dieta sólida, con un alto porcentaje de azúcar, por lo que es posible que el incremento de la expresión de SREBP-1c en respuesta a una ingesta de fructosa dependa del tipo de administración de la misma.

Otro dato a destacar referente a SREBP-1c en el presente trabajo es su falta de activación frente a una situación de hiperinsulinemia. Teniendo en cuenta que la insulina promueve la transcripción y la maduración de SREBP-1c para estimular la síntesis de ácidos grasos (Azzout-Marniche y col., 2000; Shimomura y col., 1999), se podría esperar un aumento de la forma madura de SREBP-1c en el hígado de las ratas del grupo fructosa. De hecho, algunos estudios indican que la hiperinsulinemia asociada a la resistencia a la insulina es la principal responsable del aumento de la síntesis de ácidos grasos a nivel hepático y de la hipertrigliceridemia asociada a esta condición patológica a través de la estimulación prolongada del factor de transcripción SREBP-1c (Shimomura y col., 2000; Tobe y col., 2001). Así, frente a la ausencia de cambios en los niveles de la forma madura de SREBP-1c y en la expresión de su gen diana GK, incluso en una situación de hiperinsulinemia, se puede descartar que la activación de SREBP-1c sea la responsable de la inducción de la lipogénesis y del aumento de la concentración de triglicéridos en plasma en nuestro modelo experimental.

En el presente trabajo, las ratas del grupo fructosa presentaban un 70% más de triglicéridos en plasma con respecto a las ratas del grupo control. Con el objetivo de analizar en qué fracción lipoproteica eran transportados los triglicéridos plasmáticos, se realizó una cromatografía FPLC (*fast protein liquid chromatography*) a partir de muestras plasmáticas. El análisis demostró un origen hepático de los mismos, ya que éstos formaban parte de las partículas VLDL (*very low-density lipoprotein*), que se sintetizan en el hígado como respuesta a un estado elevado de lipogénesis en este tejido. Estos datos confirman la gran capacidad lipogénica que presenta el hígado frente a una suplementación con fructosa, que sin embargo es incapaz de producir algún tipo de alteración sobre los niveles en plasma de las partículas LDL (*low-density lipoprotein*) y HDL (*high-density lipoprotein*), ricas en colesterol, tal y como también demuestra los análisis de

esta cromatografía. Además, los valores plasmáticos de colesterol total no se vieron modificados tras la suplementación con fructosa líquida, lo que sugiere que este azúcar, al menos en nuestro modelo experimental, carece de la capacidad de alterar el metabolismo de colesterol en hígado. Estos datos contrastan con los obtenidos en el estudio de Jameel y colaboradores (2014), en el cual se demuestra cómo una suplementación de fructosa en humanos induce un aumento en los niveles de colesterol plasmáticos, así como en los niveles de colesterol presente en partículas LDL y HDL.

Esta lipogénesis hepática debida a la suplementación con fructosa es debida, en parte, a la capacidad que presenta este azúcar de inducir la vía de la glucólisis, gracias al aumento de la expresión de marcadores de esta vía, como son la FK, la GAPDH y la LPK. El resultado final de este proceso es la formación de piruvato, que se destinará a la formación de triglicéridos. Sin embargo, esta inducción del flujo glucolítico por parte de la fructosa es tan fuerte que se genera una gran cantidad de piruvato y algunas moléculas de este metabolito se destinarán a la vía de las pentosa fosfato o a la formación de ácido láctico, tal y como demuestra el aumento en los niveles de los genes *g6pdh* y *ldh*, respectivamente.

A la hora de analizar con más detenimiento el contenido graso del hígado, se observó cómo la suplementación con fructosa provocaba un aumento del contenido total de triglicéridos en este tejido. Estos datos, junto con el análisis de las tinciones de Oil Red O, confirman la esteatosis hepática producida por la ingesta de fructosa. Los ácidos grasos están implicados en el desarrollo de resistencia hepática a la insulina asociada con un cuadro de obesidad. Así, Fukuchi y colaboradores (2004) demostraron cómo una suplementación de sacarosa al 34% (p/v) durante 12 semanas producía un aumento de los niveles de ácido palmitoleico y oleico, los dos componentes principales de la familia de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), tanto a nivel plasmático como en todos los tejidos analizados. Por el contrario, los niveles de ácido linoleico y araquidónico, los dos componentes principales de la familia de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) se encontraban disminuidos. En este mismo estudio, se detalla cómo una reducción en la suplementación de sacarosa de 12 a 4 semanas provoca que estas modificaciones únicamente se observen en plasma y en hígado, desapareciendo las mismas en tejido adiposo y en tejido muscular. Estos datos sugieren que el hígado se trata del primer tejido en el cual se produce una alteración del metabolismo lipídico como consecuencia de una dieta rica en carbohidratos, y que las alteraciones en la composición de ácidos grasos observadas en este tejido pueden conducir a cambios en la composición de los mismos en otros tejidos si continúa este tipo de ingesta.

Un estudio más reciente en este campo muestra cómo ratones que sobreexpresan ChREBP presentan, a nivel hepático, un incremento en la actividad SCD1 (*stearoyl-CoA desaturase 1*) y en el contenido de MUFAs. Estos animales muestran hígado graso y una evidente esteatosis hepática, pero estas alteraciones no se relacionan con un estado de resistencia a la insulina en hígado (Benhamed y col. 2012). De esta forma, se plantea por primera vez la posibilidad de la

existencia de un acúmulo lipídico en tejido hepático, pero sin efectos adversos sobre la homeostasis de la glucosa en este tejido.

Con referencia al catabolismo lipídico en hígado, el consumo de fructosa redujo la actividad de β -oxidación de los ácidos grasos en un 23%, tal y como se había observado en trabajos anteriores (Rebollo y col., 2014b). En estos trabajos, esta disminución de la β -oxidación hepática fue debida al descenso en la actividad del factor de transcripción clave en este proceso, PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*). Como consecuencia de ello, los niveles de PPAR α , así como la expresión de dos de sus genes diana, *aco* y *cpt1*, se encontraron disminuidos en aquellas ratas que habían consumido fructosa durante los 14 días de estudio. Sin embargo, en el presente trabajo no se observaron cambios en la expresión del gen *ppara*, así como tampoco de *aco* y *cpt1*, por lo que debe existir algún otro mecanismo responsable del descenso en la β -oxidación de ácidos grasos independiente de la actividad de este factor de transcripción. Además, a pesar de que se observasen ligeros cambios en la expresión de genes como *pgc1 α* y *hnf4*, ambos relacionados con la actividad PPAR α , ninguno de ellos se vio modificado a nivel proteico tras una suplementación con fructosa líquida, lo que confirma definitivamente que la disminución en la β -oxidación de ácidos grasos en hígado de las ratas del grupo fructosa es independiente de la actividad PPAR α .

Relacionado con el sistema PPAR α , se observó cómo la suplementación con fructosa durante 56 días no inducía un aumento en el grado de acetilación del cofactor PGC1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1*) en el hígado. Este dato es muy importante, ya que estudios previos demostraron cómo una suplementación de fructosa durante 14 días provocaba una inactivación por hiperacetilación de PGC1 α , que conducía a una disminución de la β -oxidación de ácidos grasos (Rebollo y col., 2014b). Este aumento en el grado de acetilación de PGC1 α observado a 14 días fue debido a la disminución, tanto de los niveles de la desacetilasa Sirt1 (*silent information regulator 1*) como de los niveles de la proteína NAMPT (*nicotinamide phosphoribosyltransferase*), que se encarga de la síntesis del cofactor NAD⁺. En el presente trabajo, el aumento en el tiempo de suplementación provocó que, a pesar de que los niveles de Sirt1 continuasen disminuidos en el hígado de las ratas del grupo fructosa, los niveles de NAMPT se encontrasen aumentados. De esta forma, el hígado fue capaz de mantener la actividad desacetilasa de Sirt1 y, por este motivo, los niveles de acetilación de PGC1 α no se vieron modificados tras una ingesta de fructosa líquida durante 56 días. Así, mediante este sistema compensador, el hígado de las ratas fructosa fue capaz de reparar, en parte, un mecanismo de inducción de esteatosis que hubiese agravado todavía más su estado.

El incremento en la expresión de la proteína GPAT (*glycerol-3-phosphate acyl transferase*) podría explicar el descenso observado en la β -oxidación hepática de las ratas suplementadas con fructosa, ya que este enzima compite con el transportador CPT1 por la molécula de acil-CoA, por lo que reduciría de esta manera la disponibilidad de sustrato para la β -oxidación (Wendel y col., 2009). Además, la inhibición hepática de esta β -oxidación podría estar también relacionada con la inhibición alostérica del enzima CPT1 por las moléculas de malonil-CoA

formadas como resultado de un aumento en la expresión de la proteína ACC, fenómeno que ya se observó en estudios previos (Rebollo y col., 2014b). Debido a su relación con ACC, se analizó también el grado de fosforilación y de activación de la proteína AMPK α (5' *AMP-activated protein kinase*), después de una suplementación con fructosa líquida. La cinasa AMPK α regula los niveles de ácidos grasos en células hepáticas, a través de la fosforilación e inhibición de ACC (*acetyl-CoA carboxylase*) y la subsecuente reducción de los niveles de malonil-CoA (Zhou y col., 2001; Zang y col., 2004). Además, se ha observado a nivel hepático cómo AMPK α inhibe la expresión de los genes lipogénicos a través de la fosforilación de ChREBP, que reduce su capacidad de unión al DNA, y a través de la reducción de la expresión de SREBP-1c (Kawaguchi y col., 2002; Zhou y col., 2001). AMPK α adquiere además gran importancia ya que, al igual que Sirt1, es capaz de regular la actividad de PPAR α , ya sea de manera directa o de una manera dependiente de PGC1 α (Grabacka y col., 2013). En el presente trabajo, el grado de fosforilación de AMPK α tras la suplementación con fructosa no resultó modificado, por lo que en nuestro modelo experimental esta proteína no parece la responsable de la β -oxidación hepática de ácidos grasos.

Efectos de la fructosa sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos en tejido muscular esquelético

Debido a que el tejido muscular esquelético juega un papel importante en la regulación de la homeostasis de la glucosa dependiente de insulina, en el presente trabajo también se analizó el posible efecto que podía tener una suplementación de fructosa durante 56 días sobre este tejido. Así, se analizaron diferentes marcadores, todos ellos relacionados con el metabolismo de carbohidratos y lípidos.

Los primeros de estos marcadores estudiados fueron los que hacen referencia a la captación y metabolización de la fructosa por parte del tejido muscular. Es el caso del transportador GLUT5, presente en la membrana plasmática de las células musculares y que se encarga de captar la fructosa presente en plasma. Debido a que se ha descrito que la fructosa es un azúcar capaz de regular su propio metabolismo (Havel, 2005) y que, además, ya hay en la bibliografía artículos que muestran cómo la fructosa es capaz de inducir la expresión de GLUT5 (Johnson, Perez-Pozo y col., 2009), hubiésemos esperado cómo una suplementación con fructosa provocaba un aumento en los niveles de este marcador. Sin embargo, en nuestro modelo experimental, esta suplementación no fue suficiente como para incrementar la cantidad del transportador GLUT5 en tejido muscular. A continuación, se analizaron los niveles del enzima fructocinasa, el primero que participa en la metabolización de la fructosa. A diferencia de lo que ocurría en hígado, la ingesta de fructosa no fue suficiente como para inducir la expresión de FK en tejido muscular, seguramente debido a que en este tejido no se produjo una mayor entrada de fructosa en la célula, algo que sí ocurría en el hígado. Los estudios de Johnson, Perez-Pozo y colaboradores (2009) muestran cómo una administración de fructosa también induce la expresión de fructocinasa; sin embargo, parece ser que esta capacidad que tiene este azúcar en inducir su

propio metabolismo es importante en tejidos como intestino, hígado y riñón, pero no tanto a nivel muscular.

Se analizaron también los niveles del transportador GLUT4 de glucosa, que es dependiente de insulina en este tejido. Armoni y colaboradores (2005) demostraron en humanos que pacientes con hiperlipidemia, entre los que se incluían enfermos de diabetes tipo 2, presentaban hasta un 30% de reducción en los niveles de esta proteína. Sin embargo, este estudio se realizó a partir de células cardíacas extraídas por biopsia, por lo que dificulta la comparación con nuestros resultados. Aun así, en el tejido muscular esquelético de las ratas suplementadas con fructosa se observó una ligera disminución del 22%, aunque significativa, de los niveles de mRNA del transportador GLUT4. Estos datos podrían sugerir que las ratas que habían ingerido fructosa líquida presentaban una menor capacidad de captar glucosa plasmática por parte del tejido muscular esquelético en respuesta a una hiperinsulinemia.

A continuación, se analizaron los niveles de expresión de factores de transcripción responsables de la regulación del catabolismo de lípidos en el tejido muscular. Es el caso de las proteínas PPAR α , PPAR β/δ y PGC1 α , algunas de las cuales ya se habían analizado también en hígado. A pesar de que se observó una disminución en los niveles de mRNA que codifican para estas tres proteínas, la expresión a nivel de proteína no se vio modificada. Estos datos se corroboraron mediante el análisis de los niveles de los genes *cpt1b* y *pdk4*, dianas para el factor de transcripción PPAR α .

Estos resultados en tejido muscular, en los que se obtiene un efecto prácticamente nulo como consecuencia de una ingesta de fructosa, podrían ser debidos a la poca cantidad de fructosa que llega al músculo por circulación sistémica, ya que la mayoría de este azúcar que entra en el organismo se metaboliza a nivel hepático (Schaefer y col., 2009). Es por esta razón que el hígado es el tejido en el cual se observan las alteraciones metabólicas más evidentes, mientras que otros tejidos, como es el caso del músculo, no son tan susceptibles de sufrir alteraciones en su metabolismo tras una suplementación de fructosa.

Sin embargo, hay un marcador que se escapa a esta conclusión. Se trata de la proteína GPR119 (*G-protein-coupled receptor 119*), un importante regulador de la oxidación de ácidos grasos en el tejido muscular. Se analizó la expresión de GPR119, tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína, observándose un aumento muy evidente en ambos casos en el músculo de ratas del grupo fructosa. Cornall y colaboradores (2009) ya propusieron esta proteína como responsable de la disminución de la oxidación de ácidos grasos en el músculo de ratas obesas. Crescenzo y colaboradores (2015) han demostrado recientemente cómo la ingesta de una dieta rica en fructosa durante sólo 2 semanas es capaz de aumentar el contenido de triglicéridos en el tejido muscular en ratas. En nuestro caso, este aumento en los niveles de GPR119 podría ser el responsable de un acúmulo de lípidos en este tejido. Sin embargo, en el presente trabajo, una suplementación con fructosa líquida durante 56 días no fue capaz de aumentar los niveles de lípidos en el tejido muscular (datos no mostrados).

2) Efectos de la fructosa sobre el estrés de retículo, inflamación y estrés oxidativo

Otro de los objetivos del presente trabajo consistió en analizar el efecto de la fructosa sobre la vía del estrés del retículo endoplasmático (RE). Estudios de Ren y colaboradores (2012) demostraron en ratones cómo una ingesta de fructosa en la dieta causaba un incremento en la lipogénesis de novo en el hígado, que estaba relacionado con una inducción del estrés del RE. En el presente trabajo, aunque la suplementación con fructosa líquida incrementó la lipogénesis hepática en ratas tras 56 días de estudio, la mayoría de los marcadores de estrés de retículo endoplasmático permanecieron inalterados. Se detectó un incremento muy evidente de los niveles de fosforilación de la proteína IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*), pero los niveles de la forma *splicing* de XBP1 (*X-box binding protein 1*) no se vieron modificados, a diferencia de lo que ocurría cuando el tiempo de suplementación de fructosa era de 14 días (Rebollo y col., 2014a).

Se analizaron también los niveles de las proteínas clave en las otras dos ramas de la respuesta UPR (*unfolded protein response*), la cinasa PERK (*protein kinase-like endoplasmatic reticulum kinase*) y el factor de transcripción ATF6 (*activating transcription factor 6*). La primera de ellas presentó una ligera disminución en los niveles totales de proteína, mientras que la segunda no vio modificada su expresión tras una suplementación con fructosa durante 56 días. Como resultado, la expresión de los genes diana regulados por estas proteínas no se vio modificada. Estos resultados indican una activación “atípica” de la vía del estrés de retículo, ya que estudios en este campo muestran una activación simultánea de las tres ramas que forman parte de la UPR como respuesta a un estímulo capaz de desencadenar la señal.

La cantidad de fructosa utilizada en el presente trabajo no parece ser la explicación para entender esta falta de activación de la respuesta UPR. Así, un estudio de Su y colaboradores (2014) demostró que animales que recibieron un aporte calórico procedente de la fructosa similar a las ratas del presente estudio (60%), presentaron un aumento en la expresión de marcadores del estrés de RE, si bien el modelo animal utilizado en este estudio fue el ratón. Sin embargo, la longitud del tratamiento sí parece ser un factor crítico para explicar las diferencias observadas en la respuesta UPR, ya que un consumo de fructosa durante 56 días no provoca una activación normal de las vías del estrés del retículo endoplasmático, a diferencia de lo que ocurre tras una suplementación de fructosa líquida en un periodo de 2-3 semanas (Rebollo y col., 2014a; Su y col., 2014).

Lee y colaboradores (2008) demuestran cómo XBP1s participa en la biosíntesis de lípidos, mediante su capacidad de regular la expresión de genes como *dgat*, *scd1* o *acc2*. Además, este estudio demostró cómo XBP1s regula genes lipogénicos de una manera independiente de SREBP y ChREBP. Este grupo de investigación demostró que los niveles de XBP1s en hígado estaban sobreexpresados en ratones alimentados con una dieta al 60% de fructosa, lo que implica un incremento en los niveles de la forma *splicing* de este mensajero por parte de la proteína IRE1. Sin embargo, marcadores típicos de estrés de RE como BiP o CHOP no se indujeron tras el tratamiento, indicando en este caso la ausencia de estrés de retículo. En nuestro caso, tras los datos obtenidos en el presente trabajo, se puede deducir que esta activación “atípica” de la

respuesta UPR carece también de la capacidad de inducir la lipogénesis dependiente de XBP1s, a pesar de que la fosforilación de la proteína IRE1 resultó muy evidente. De esta forma, el factor de transcripción ChREBP adquiere gran importancia en nuestro modelo experimental como principal regulador de genes que inducen la lipogénesis hepática en ratas suplementadas con fructosa líquida durante 56 días.

Tras el análisis de los niveles de la forma *splicing* de XBP1, quedó demostrado la incapacidad que tenía la proteína IRE1 de actuar como endoribonucleasa sobre este factor de transcripción. Sin embargo, se observó cómo la activación de IRE1 en hígado de ratas fructosa sí era capaz de degradar algunos mRNAs, como fue el caso de *IκB* (*inhibitor of kappa B*). No obstante, esta disminución en los niveles de mRNA de *IκB* no implicó una disminución en los niveles de esta proteína y, como consecuencia de ello, la suplementación con fructosa no modificó el grado de activación del factor de transcripción proinflamatorio NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Se analizó también el nivel de expresión del marcador de inflamación TNFα (*tumor necrosis factor alpha*), como posible efecto de una activación del estrés de retículo tras una ingesta de fructosa. Los datos obtenidos demuestran una ausencia de inflamación debida a esta vía metabólica en hígado. Además, se valoraron los niveles de expresión de TNFα también en tejido adiposo, obteniéndose los mismos resultados que en hígado: la suplementación con fructosa líquida no inducía el aumento de este marcador.

Debido a que únicamente la fosforilación de la proteína IRE1 fue la modificación más evidente en la respuesta UPR observada tras la suplementación con fructosa, y tras observar que la actividad endoribonucleasa de esta proteína no se activó tras una ingesta de fructosa, se decidió analizar el posible efecto de la actividad cinasa de IRE1. Para ello, se estudió el grado de fosforilación de una diana para IRE1, como es JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), cuya activación por esta cinasa ha sido relacionada con fenómenos de resistencia a la insulina en hígado (Chan y col., 2013). Sin embargo, nuestros datos demuestran una ausencia en la fosforilación de JNK en ratas suplementadas con fructosa líquida, por lo que podemos concluir que una ingesta de fructosa induce un incremento en la fosforilación de la proteína IRE1, que aun así carece de su capacidad endoribonucleasa y cinasa, por lo que los efectos que esta fosforilación comporta permanecen a la espera de ser descubiertos en nuestro modelo experimental.

A pesar de esta nula fosforilación en la proteína JNK en el hígado de ratas fructosa, los resultados del presente trabajo muestran semejanzas con los obtenidos por Kato y colaboradores (2012), que demuestran cómo un estrés de retículo puede activar al complejo mTORC1 e inducir la activación de la vía IRE1-JNK, sin afectar a las ramas UPR en las que participan PERK y ATF6. El tiempo de suplementación de fructosa podría ser de nuevo crítico en este aspecto y, probablemente, un estudio más prolongado podría ser suficiente como para inducir la fosforilación de JNK y así reproducir los resultados de este grupo de investigación.

Son muchos los estudios que asocian una ingesta de fructosa con procesos de inflamación, ya sean debidos a un aumento en los niveles de endotoxinas en plasma o como resultado de la estrecha relación entre estrés del retículo endoplasmático e inflamación. Spruss y colaboradores

(2009) demostraron en ratones cómo una ingesta de fructosa conduce a un incremento de los niveles de endotoxinas en plasma, como resultado de un aumento en la permeabilidad intestinal de estas moléculas. Sin embargo, en nuestro modelo experimental no se observó este efecto tras la suplementación con fructosa, que tampoco fue capaz de aumentar la expresión de marcadores de inflamación como *tlr-4* (*toll-like receptor 4*) y *myd88* (*myeloid differentiation factor 88*), tanto en hígado como en tejido adiposo. La mayoría de estudios que relacionan una ingesta de fructosa con un estado de endotoxemia utilizan ratones como modelo experimental y la administración de fructosa difiere de la nuestra, pues en estos estudios se trabaja con altos porcentajes de fructosa, a veces en estado sólido. Por tanto, parece ser que en el caso del aumento de endotoxinas en plasma debido a la ingesta de fructosa, el modelo experimental juega un papel crucial.

Otros marcadores analizados y de gran interés como marcadores de inflamación fueron los genes *nlrp3*, *mcp-1* y *pai-1*. Ninguno de ellos vio modificada su expresión tras una suplementación con fructosa líquida, tanto en el hígado como en el tejido adiposo. Estos datos continúan indicando un escaso estado inflamatorio tras una ingesta de fructosa. Sin embargo, es curioso destacar el caso de las metalotioneínas *mt-1* y *mt-2*. En ambos casos, la suplementación con fructosa disminuyó los niveles de mRNA que codifica para estas dos proteínas, a diferencia de lo esperado inicialmente.

La proteína 11β -HSD1 (*11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1*) podría jugar un papel importante como agente inhibidor de la respuesta inflamatoria en el hígado y en el tejido adiposo de ratas suplementadas con fructosa. Esta proteína participa en la síntesis de cortisol, una molécula anti-inflamatoria que podría revertir el proceso de inflamación en estos tejidos. Ahmed y colaboradores (2008) demostraron cómo en pacientes con esteatosis hepática de origen alcohólico, los niveles de la proteína 11β -HSD1 se encontraban aumentados hasta 5 veces. A pesar de que la esteatosis de nuestras ratas no era de origen alcohólico, estos datos nos llevaron a pensar en la posibilidad de que en nuestro modelo experimental esta proteína también se encontrase aumentada, explicando así una ausencia de inflamación en hígado y también en tejido adiposo. Sin embargo, en el presente trabajo, se observó cómo los niveles de mRNA de *11 β -hsd1* no se vieron modificados tras una suplementación con fructosa, ni en el hígado ni en el tejido adiposo. Estos datos demuestran que, al menos en nuestro modelo experimental, la proteína 11β -HSD1 no parece ser la responsable de que en estos dos tejidos nos encontremos con una ausencia de inflamación.

Otra posible causa de la ausencia de inflamación, esta vez en hígado de ratas suplementadas con fructosa, podría ser la que hace referencia a un descenso en los niveles de ácido araquidónico en este tejido. Esta molécula forma parte de los fosfolípidos de la membrana celular y puede metabolizarse mediante la acción de las ciclooxigenasas. Como resultado de esta metabolización, se generan derivados de este ácido araquidónico, conocidos como eicosanoides, capaces de generar prostaglandinas y leucotrienos (Korotkova y Lundberg, 2014), que favorecen la respuesta inflamatoria. La disminución de ácido araquidónico en el hígado de

ratas que habían ingerido fructosa, podría resultar en un descenso en la disponibilidad de sustrato para la síntesis de estas sustancias que median en la respuesta inflamatoria. De esta manera, a pesar de que son muchos los estudios que relacionan una esteatosis hepática con un estado de inflamación, en nuestro modelo experimental las ratas suplementadas con fructosa presentarían, paradójicamente, una “resistencia a la inflamación”.

Se analizó también la capacidad de la fructosa de producir fibrosis en hígado y en tejido adiposo. Para ello, se analizaron los niveles del marcador de fibrosis *colla1* (*collagenase-1*) y se observó cómo una suplementación de fructosa no inducía ningún cambio en este aspecto, ni en el hígado ni en el tejido adiposo. Además, estos datos se confirmaron con la tinción de Masson para valorar el estado histopatológico del hígado, y en la que no se observaron cambios entre las muestras de las ratas del grupo control y las ratas del grupo fructosa. Es importante destacar que una fibrosis hepática es el resultado de diversas enfermedades crónicas en el hígado, asociadas a un proceso inflamatorio, entre las que se incluyen la esteatohepatitis no alcohólica (cuadro más severo de la esteatosis hepática no alcohólica), por lo que probablemente, un tiempo de suplementación de 56 días no sea suficiente como para observar esta patología.

Por último, se valoró la capacidad de la fructosa de producir necrosis hepática, mediante la tinción de hematoxilina y eosina. Así, se comprobó cómo la suplementación de fructosa durante 56 días no fue suficiente para inducir este fenómeno. Esta observación se corroboró con los datos de los niveles plasmáticos del enzima alanina aminotransferasa (ALT). Las ratas fructosa presentaban un descenso de los mismos del 28%, con respecto a las ratas control (resultados no mostrados); si bien esta disminución posiblemente carece de relevancia fisiológica.

Los procesos de inflamación, fibrosis y necrosis se encuentran estrechamente relacionados (Zivkovic y col., 2007), por lo que quizá un estudio con una suplementación de fructosa más prolongada en el tiempo podría reflejar la aparición de estos tres fenómenos.

Estrechamente relacionado con la inflamación, se encuentra el estrés oxidativo, un fenómeno que tiene lugar cuando se produce un desequilibrio entre la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad del organismo para reparar el daño resultante. Ye (2013) define a las ROS como agentes capaces de inhibir la transducción de la señal de insulina, propiciando así un fenómeno de resistencia a esta hormona. Se ha descrito cómo en un estado de obesidad, el estrés oxidativo ocurre debido a un acúmulo de ácidos grasos y glucosa en el interior de la mitocondria, estableciéndose así otra manera de asociar hiperlipidemia e hiperglucemia con obesidad (Furukawa y col., 2004).

En el presente trabajo se analizaron los niveles de mRNA de marcadores de estrés oxidativo, como son *nrf2*, *sod2* y *gpx1*. El primero de ellos se trata de un factor de transcripción que regula la expresión de *sod2* y de *gpx1*, y presentó unos niveles disminuidos en el hígado de ratas suplementadas con fructosa. A pesar de esta disminución, los niveles de mRNA de sus dos genes diana no se vieron alterados en estos animales. Se analizaron también los niveles de mRNA de

estos tres marcadores en el tejido adiposo, sin que la suplementación con fructosa líquida produjese algún tipo de alteración.

Así, con respecto al estrés oxidativo, la suplementación con fructosa durante 56 días sólo produjo una disminución de los niveles de mRNA que codifica para el factor de transcripción Nrf2 en muestras de hígado. En este aspecto, Cullinan y colaboradores (2003) establecen un nexo entre el estrés del RE y el estrés oxidativo, ya que demuestran cómo la proteína PERK es capaz de fosforilar a Nrf2 después de una activación de la respuesta UPR, lo que resulta en una translocación a núcleo de esta proteína. En esta nueva localización celular, Nrf2 se encarga de regular la transcripción de genes que codifican para proteínas antioxidantes y enzimas detoxificantes. De esta forma, una bajada en los niveles de proteína PERK en el hígado de ratas suplementadas con fructosa líquida conduciría a una disminución en la fosforilación de Nrf2, que podría implicar un descenso en la actividad de este factor de transcripción, disminuyendo así la expresión de sus genes diana.

3) Efectos de la fructosa sobre la vía de la autofagia

En el presente trabajo se demuestra cómo un consumo de fructosa líquida durante 56 días provoca una disminución en el catabolismo de ácidos grasos. Sin embargo, mientras que en una suplementación semiaguda los mecanismos implicados en esta disminución dependen de la inhibición de la actividad PPAR α (Rebollo y col., 2014b), los efectos de una suplementación subcrónica están relacionados con una inhibición en la autofagia hepática.

La autofagia (también llamada macroautofagia) es un proceso homeostático que se desencadena en respuesta a determinadas condiciones ambientales, como una falta de nutrientes, y que recientemente se ha visto relacionado con la aparición de diversas condiciones patológicas, entre las que se incluye el síndrome metabólico (Choi y col., 2013). Son varios los estudios que demuestran cómo una inhibición de la autofagia puede ser debida a la activación del complejo mTORC1, como consecuencia de una alta concentración de glucosa intracelular (Kim y col., 2011).

Nuestros resultados muestran, tal y como ya ocurría en estudios previos (Rebollo y col., 2014), cómo en el hígado de las ratas que habían ingerido fructosa se produce un incremento significativo del grado de fosforilación de la proteína mTOR, que comporta la activación de la misma, así como del complejo mTORC1. Como resultado de esta activación, se observó también en el presente trabajo la fosforilación de la diana de esta cinasa, la proteína 4E-BP1 (*eIF4E binding protein*), que juega un papel clave como represor de la traducción de nuevas proteínas y del crecimiento celular. Sin embargo, otra diana muy bien descrita de mTORC1, la proteína rpS6 no vio modificada su grado de fosforilación como consecuencia de la activación de mTORC1. Este dato sugiere que, probablemente, el complejo mTORC1 presente mayor afinidad por algunas de sus dianas, como es el caso de la proteína 4E-BP1.

Se realizaron una serie de análisis con el objetivo de encontrar el mecanismo responsable de la fosforilación y activación de mTOR. Lee y colaboradores (2009) establecieron un nexo entre las vías de la glucólisis y de la autofagia, ya que demostraron cómo un alto índice glucolítico aumentaba la unión de la proteína Rheb (*ras homolog enriched in brain*) con el complejo mTOR, provocando la activación del mismo y la inhibición de la autofagia. Como consecuencia del aumento en esta interacción, estos investigadores también observaron una disminución de la unión entre Rheb y GAPDH. En el presente trabajo, se analizó el efecto de la ingesta de fructosa sobre el grado de unión de estas proteínas y se observó que la suplementación con este azúcar no era capaz de modificar el nivel de unión de Rheb a mTOR y a GAPDH. A pesar de que en el presente estudio las ratas suplementadas con fructosa presentaban un hígado con mayor índice glucolítico, reflejado mediante el aumento en la expresión de marcadores que participan en la glucólisis, en el caso de Lee y colaboradores (2009), éste era debido a un incremento en la cantidad de glucosa intracelular. Ya que en nuestro caso, las células hepáticas presentaban mayor concentración de fructosa y no de glucosa, nuestros resultados podrían indicar que el tipo de carbohidrato es clave en la regulación de la autofagia mediante la unión mTOR-Rheb.

Efeyan y colaboradores (2013) demostraron que otro tipo de GTPasas, las proteínas RagA-D, eran capaces de unirse y activar a mTOR tras determinados estímulos celulares. En el presente trabajo, se analizó el grado de asociación entre RagC y mTOR en muestras de hígado y se observó cómo la suplementación con fructosa no inducía ninguna modificación al respecto. Este resultado era esperado, ya que las proteínas RagC se activan, sobretodo, tras un aumento en la concentración intracelular de aminoácidos y, en menor medida, de glucosa; pero no así de fructosa.

Por otro lado, se ha descrito cómo el ensamblado de los componentes que forman parte del complejo mTORC1, fenómeno que permite la activación del mismo, es regulado por el complejo multiproteico conocido como Tel2-Tti1-Tti2 (TTT)-RUVBL1/2 (Kim y col., 2013). Se ha descrito una correlación positiva entre los mRNAs de este complejo y la activación de mTORC1. Sin embargo, este mecanismo parece no estar involucrado en la activación del complejo mTORC1 en nuestro modelo experimental, ya que no se observaron cambios en los niveles de los genes *ruvbl1* y *tti*, así como tampoco en los niveles de la proteína Telo2 y en el grado de asociación entre mTOR y Telo2.

Se planteó la posibilidad de que esta activación de mTORC1 en el hígado de ratas fructosa pudiera ser debida al aumento en la fosforilación del residuo treonina¹⁴⁶² de la proteína TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*), ya que son varios los estudios que demuestran cómo una fosforilación en este residuo en concreto suprime el efecto inhibitorio del complejo TSC1/2 sobre mTORC1 (Zang y col., 2003; Shimobayasi y col., 2014). Sin embargo, el mecanismo por el cual TSC2 es fosforilado en nuestro modelo experimental permanece todavía desconocido, ya que se examinaron distintas cinasas capaces de fosforilar a esta proteína (p38, Akt, ERK, AMPK, GSK3 β), sin que ninguna de ellas estuviese activada en las ratas suplementadas con fructosa.

Además de los marcadores típicos de autofagia analizados, se observó cómo los niveles de la proteína desacetilasa Sirt1 se encontraban disminuidos en el hígado de las ratas suplementadas con fructosa. Ya se ha explicado cómo esta disminución de Sirt1 tiene importancia en la regulación del catabolismo de lípidos, pero también puede ser importante en la autofagia, ya que recientemente se ha descrito cómo esta proteína es capaz de regular este proceso. Ghosh y colaboradores (2010) demuestran que una deficiencia en Sirt1 resulta en un aumento en la señalización por mTOR. Concretamente, este grupo de investigación describe cómo la desacetilasa Sirt1 regula la actividad de mTOR a través del complejo TSC1/2.

Independientemente del mecanismo implicado, los resultados del presente estudio muestran que una suplementación con fructosa induce la fosforilación de mTOR en su residuo serina²⁴⁸¹, que se trata de una posición de autofosforilación considerada como un biomarcador de la actividad del complejo mTORC1 (Soliman y col., 2010). Además, este incremento en la autofosforilación de mTOR en ratas suplementadas con fructosa líquida durante 56 días se vio acompañada de un aumento en la transcripción de genes implicados en las vías de la glucólisis y de las pentosa fosfato, lo que confirma una activación del complejo mTORC1 (Soliman y col., 2010; Düvel y col., 2010). Así, la activación de mTORC1 es, probablemente, la razón por la cual se observa un aumento de casi 3 veces⁷⁵⁷ en la fosforilación del residuo serina⁷⁵⁷ de la proteína Ulk1 (*uncoordinated 51-like kinase 1*) en el hígado de las ratas del grupo fructosa, que tiene como consecuencia la inhibición de la autofagia, tal y como se comprueba a la hora de analizar la reducción del marcador de autofagia LC3-II.

Se ha observado cómo un descenso en la actividad autofágica en roedores obesos o en roedores que ingieren dietas ricas en grasa, puede ser debido a la inhibición de la formación de la estructura celular conocida como autofagosoma, o también debido a defectos en los lisosomas o en la fusión entre éstos y los autofagosomas (Shimobayashi y col., 2014). Nuestros resultados apuntan hacia la primera de estas causas, ya que la proteína Ulk1 es un regulador clave en la formación del fagóforo, una estructura pre-autofagosomal. En efecto, se ha descrito cómo una inhibición de Ulk1, gracias a la fosforilación de su residuo inhibitorio serina⁷⁵⁷ por el complejo mTORC1, inhibe la fase inicial de la vía autofágica (Petherick y col, 2015).

Relacionado con este aumento en la fosforilación de Ulk1 en ratas del grupo fructosa, en el presente estudio también se observó una disminución de los niveles de LC3-II, un marcador de autofagia que se encuentra relacionado con el cierre de la membrana para formar un autofagosoma vesicular. Estos resultados, junto con la inhibición por fosforilación de Ulk1, confirman una disminución de la autofagia en ratas suplementadas con fructosa (Buratta y col., 2015). Además, a pesar de que en el presente trabajo no se midió directamente la actividad autofágica mediante cambios en los niveles de LC3-II en presencia o ausencia de inhibidores lisosomales, sí se observó un incremento significativo del sustrato autofágico p62, que también indicaría una disminución del flujo de la autofagia (Klionsky y col., 2012). Sin embargo, los niveles de la proteína lamp1 (*lysosomal-associated membrane protein-1*) no se vieron reducidos en muestras de hígado de ratas suplementadas con fructosa, lo que sugiere que el fenómeno de

fusión de los autofagosomas con los lisosomas no se vio afectado. Además, los niveles de la proteína beclina-1, un marcador del inicio de la formación del autofagosoma, tampoco se vieron modificados en nuestro modelo experimental.

Estos datos muestran por primera vez cómo una ingesta de fructosa produce un descenso en la autofagia hepática. A pesar de que un estudio previo de Aijälä y colaboradores (2013) mostró un aumento en ratas de los marcadores de autofagia tras un consumo de fructosa, el modelo experimental usado, bastante alejado del utilizado en el presente trabajo, así como la forma de administrar la fructosa (en este caso, dieta sólida), hace que sea difícil comparar estos datos con los obtenidos a partir de nuestro estudio.

Recientemente, se ha descrito cómo una acumulación de lípidos en hepatocitos en forma de *lipids droplets* puede ser disipada gracias a la autofagia, en un proceso conocido como lipofagia (Singh y col., 2009). La inhibición genética o farmacológica de la autofagia, ya sea *in vivo* o *in vitro*, promueve la acumulación de triglicéridos en el hepatocito, mientras que la activación de la misma usando fármacos como la rapamicina, un inhibidor de mTORC1, reduce la esteatosis hepática en ratones con hígado graso, tanto de origen alcohólico como no alcohólico (Lin y col., 2013). Además, recientemente se ha descrito cómo esta relación autofagia-esteatosis hepática también actúa en el otro sentido, ya que una acumulación intracelular de lípidos inhibe la autofagia en ratones alimentados con dieta grasa, lo que conlleva a un cuadro de obesidad y de hígado graso (Singh y col., 2009; Yang y col., 2010). En el presente trabajo, las ratas suplementadas con fructosa mostraron una elevada adiposidad y un aumento significativo de la acumulación de lípidos en el hígado, que podría explicar, al menos en parte, defectos en la actividad autofágica. Teniendo en cuenta estos análisis, podemos hipotetizar que en el hígado de aquellas ratas que han ingerido fructosa durante 56 días se ha establecido un ciclo dañino, donde la acumulación intracelular de lípidos inhibe la autofagia y, como consecuencia, la lipofagia disminuye, incrementando de esta forma los triglicéridos hepáticos y el contenido lipídico en las conocidas como *lipids droplets*.

Este descenso en la actividad autofágica en hígado puede ser responsable también de una disminución en la actividad de β -oxidación de ácidos grasos observada en ratas fructosa, ya que este fenómeno comporta un descenso en la liberación de ácidos grasos libres desde los *lipids droplets* y, como consecuencia, un déficit de sustrato para la β -oxidación (Liu y Czaja, 2013). Este fenómeno, junto con el aumento en la expresión de la proteína ACC, podría explicar la aparición de hipertrigliceridemia y esteatosis hepática en nuestro modelo animal.

En resumen, tras analizar el efecto de la suplementación con fructosa líquida en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, así como sobre las vías del estrés de retículo endoplasmático y autofagia, podemos deducir que el tiempo de esta suplementación es un factor clave en las alteraciones metabólicas producidas por la fructosa. Así, algunos de los efectos observados en estudios previos de suplementación semiaguda de fructosa, como son la inhibición de PPAR α o la inducción del estrés de RE, desaparecen tras un periodo de suplementación más prolongado, posiblemente como una respuesta adaptativa del organismo frente a una ingesta continua de

carbohidrato. Sin embargo, algunos de los efectos observados tras una suplementación de fructosa durante 14 días, todavía persisten, como es el caso de la activación de mTOR. Además, gracias al presente trabajo, se describe por primera vez que una suplementación subcrónica de fructosa, muy similar al patrón de consumo humano, inhibe la autofagia hepática, que podría explicar tanto la inhibición de la β -oxidación como la deposición de lípidos en el hígado, sin incrementar el estrés de retículo en este tejido.

4) Efectos de la fructosa sobre la vía de señalización de la insulina

Corroborando los resultados de trabajos anteriores (Vilà y col., 2011; Rebollo y col., 2014a), la suplementación de la dieta con un 10% de fructosa en el agua de bebida durante 56 días indujo un aumento en la concentración de insulina en plasma. Sin embargo, los niveles de glucosa plasmática no se vieron modificados tras una ingesta de fructosa. Es importante destacar que una de las características de la fructosa es su incapacidad de aumentar la glucemia en plasma, debido a que en ratas y en humanos toda la fructosa se metaboliza como tal, y no mediante su conversión en glucosa. Esta hiperinsulinemia observada en las ratas del grupo fructosa provocó una ligera disminución en el índice de sensibilidad a la insulina (ISI) en estos animales.

A continuación, se analizaron marcadores en hígado de la vía de señalización de la insulina y se observó cómo las ratas suplementadas con fructosa presentaban indicios de resistencia a la insulina a nivel hepático, ya que a pesar de que las concentraciones de insulina en plasma eran superiores con respecto a las ratas del grupo control, la vía PI3K/Akt no se encontró activada en el hígado de estos animales (el grado de fosforilación de las proteínas Akt y GSK3 β no se vio incrementado). En este sentido, Valverde y colaboradores (2003) observaron una disminución de la fosforilación de las proteínas implicadas en la vía PI3K/Akt en hepatocitos deficientes en IRS2. Así, la falta de activación de esta vía observada a los 56 días de estudio probablemente es consecuencia del menor contenido de proteína IRS2 hepática (un 65% menos que las ratas control), que no es compensada por un aumento en los niveles de la proteína IRS1, que a pesar de ser el principal mediador de la señalización de la insulina en músculo esquelético, también juega un papel importante en el control del metabolismo de la glucosa a nivel hepático (Dong y col., 2006).

Goedeke y colaboradores (2013) demuestran cómo el miRNA-33 es capaz de disminuir los niveles de IRS2, induciendo así un estado de resistencia a la insulina. En el presente estudio, la disminución de los niveles de proteína IRS2 en hígado de ratas suplementadas con fructosa podría ser debida al aumento de los niveles de este miRNA observado en el hígado de estas ratas. Emanuelli y colaboradores (2000) también defienden un aumento de la expresión de SOCS3 (*supresor of citokine signaling*) como responsable de una degradación de IRS2. Sin embargo, este fenómeno parece no ser el responsable de la disminución de IRS2 en nuestro modelo experimental, ya que los niveles de proteína SOCS3 no aumentaron tras una ingesta de fructosa líquida.

Todos estos datos nos muestran un estado de resistencia a la insulina a nivel hepático que, sin embargo, no se encuentra en un estado lo suficientemente avanzado como para reducir la fosforilación de Akt y FoxO1, por lo que la expresión de los principales genes que controlan la gluconeogénesis (*pepck* y *g6pc*) no sólo no se vio incrementada, sino que se encontró disminuida. Estos datos reflejan el efecto más sorprendente de la suplementación con fructosa sobre el hígado, ya que teniendo en cuenta que el grado de fosforilación de Akt no se modificó como respuesta a una suplementación de fructosa, se observó un evidente aumento del ratio FoxO1 fosforilado con respecto a FoxO1 total, que implica una inactivación de este factor de transcripción.

Por lo tanto, una cuestión clave en el presente trabajo fue determinar qué cinasa era la responsable de la fosforilación de FoxO1. Tras el estudio de varias proteínas que pudiesen adoptar ese rol (p38, Erk1/2, SGK), se observó cómo ninguna de ellas era la responsable de la fosforilación de FoxO1 (Park y col., 1999; Collins y col., 2006; Jiao y col., 2013). Se analizaron también los niveles de mRNA de *pmrt1*, gen que codifica para una proteína capaz de regular la gluconeogénesis dependiente de FoxO1 (Han y col., 2014), sin observar cambios entre el grupo fructosa y el grupo control.

También, se planteó la posibilidad de que el aumento en el grado de fosforilación de FoxO1 no fuese debido a un incremento en la actividad de alguna cinasa, sino a una disminución de los niveles de alguna fosfatasa de este factor de transcripción. Wu y colaboradores (2010) demostraron cómo la proteína MKP-3 (*MAPK phosphatase 3*) podría estar implicada en la regulación de FoxO1, debido a su capacidad de eliminar grupos fosfato de este factor de transcripción. Así, se analizaron los niveles de expresión de proteína MKP-3 en el hígado de las ratas de este estudio, observándose una disminución del 34% en los animales del grupo fructosa. Estos datos confirman la importancia de esta fosfatasa en la regulación de los genes gluconeogénicos a nivel hepático.

Recientemente, Yue y colaboradores (2015) han demostrado cómo la proteína mTOR es capaz de fosforilar e inactivar a FoxO1. A pesar de que estos datos se obtuvieron a partir de muestras de hipocampo de ratón, un modelo experimental alejado del nuestro, podrían explicar el aumento en el grado de fosforilación de FoxO1 hepático en las ratas suplementadas con fructosa.

Llegados a este punto, se quiso comprobar si la resistencia a la insulina detectada en las ratas fructosa del estudio 1 provocaba una alteración en la curva de la glucemia en un test de tolerancia a la glucosa (TTG) tras 56 días de tratamiento. Además, un estudio de Benhamed y colaboradores (2012) en el que se trabajó con ratones que sobreexpresaban ChREBP, mostraba cómo era posible un estado de esteatosis hepática sin que esto afectase a la sensibilidad a la insulina en hígado. Dado que los resultados analizados hasta el momento presentaban paralelismo con los de este estudio de Benhamed y colaboradores (2012), de manera que una ingesta de fructosa en nuestro modelo experimental producía unos efectos similares a los observados por la sobreexpresión de ChREBP en el hígado de estos ratones, nos planteamos la

posibilidad de que en nuestro modelo experimental se estuviese produciendo esteatosis hepática pero sin conexión con resistencia a la insulina o a un estado inflamatorio.

Así, se elaboró un segundo estudio al cual se le añadió un nuevo grupo experimental, ratas suplementadas con glucosa en condiciones isocalóricas con fructosa. El objetivo del mismo era descartar que los efectos observados tras una ingesta de fructosa fuesen debidos exclusivamente a un incremento en la ingesta total de calorías. Los datos de ingesta de este segundo estudio muestran una gran similitud entre el consumo de bebida y comida entre los grupos fructosa y glucosa. De esta forma, ambos grupos consumieron al final del tratamiento algo más del 60% de calorías totales con respecto al grupo control. El consumo de cualquiera de los dos azúcares también comportó una hipertrigliceridemia y una hiperinsulinemia, mientras que los niveles de glucosa en plasma no se vieron alterados.

A la hora de analizar el test de tolerancia a la glucosa, se observó cómo la homeostasis de la glucosa se encontraba afectada tanto en el grupo fructosa como en el grupo glucosa. Sin embargo, el grado de afectación era más intenso en el grupo fructosa, ya que en este grupo los valores de glucosa plasmática se mantienen elevados a lo largo del test, a pesar de la secreción pancreática de insulina. Estos datos indicarían que, además del exceso de calorías ingeridas por parte de los animales, el metabolismo particular de la fructosa altera la homeostasis de la glucosa en el organismo.

A partir de esta observación se decidió analizar con más detalle el efecto que una suplementación con fructosa o glucosa inducía sobre la respuesta de los órganos sensibles a la insulina (hígado, tejido muscular y tejido adiposo) a una estimulación exógena de insulina, con el fin de determinar la contribución de cada uno de dichos órganos a las alteraciones detectadas en el test de tolerancia a la glucosa.

Tejido Hepático

El primero de estos órganos analizados fue el hígado, en el cual se observó cómo en situación basal (es decir, sin administración de insulina exógena) únicamente la ingesta de fructosa era capaz de disminuir de forma significativa los niveles de IRS2. En este mismo tejido se analizó también el grado de fosforilación de FoxO1, debido a su importancia sobre la homeostasis de la glucosa. De manera similar a lo que ocurría en las ratas del estudio 1, la suplementación de fructosa, y también la de glucosa, indujeron un aumento en el nivel de fosforilación de este factor de transcripción, lo que comportó su inactivación. Probablemente, como consecuencia de esta inactivación de FoxO1, la expresión de los principales genes gluconeogénicos (*g6pc* y *pepck*) no se encontró incrementada. De hecho, en el hígado de las ratas que habían ingerido fructosa, los niveles del gen *g6pc* se encontraron significativamente reducidos. Estos resultados descartan el aumento de la glucemia durante el TTG en los animales suplementados con fructosa o glucosa como consecuencia de un incremento en la síntesis hepática de nuevas moléculas de glucosa.

Se realizó una búsqueda para, al igual que ocurría en el estudio 1, encontrar el mecanismo por el cual las ratas suplementadas con fructosa o glucosa presentaban una mayor fosforilación basal de FoxO1, ya que la proteína Akt parecía no ser la responsable de este fenómeno. Así, se analizaron cinasas como SGK, Erk1/2, PKA, SIK2, además de la fosfatasa MKP-3. Ninguna de estas proteínas parece estar implicada en la inactivación por aumento de fosforilación de FoxO1.

La proteína mTOR vuelve a adquirir importancia en este estudio como una cinasa capaz de fosforilar a FoxO1. Así, las ratas suplementadas con fructosa o glucosa presentaron unos niveles de activación de mTOR elevados, con respecto a las ratas del grupo control. Esta activación se confirmó mediante la fosforilación de TSC2, aumentada de manera notable también en los animales que habían ingerido cualquiera de los dos carbohidratos.

A la hora de analizar a nivel hepático el efecto de una suplementación de fructosa o glucosa sobre la vía de señalización de la insulina, se observó cómo únicamente en el grupo fructosa los animales a los que se les había administrado insulina exógena no presentaban un aumento significativo en el grado de fosforilación de la proteína Akt con respecto a aquellos a los que no se les había administrado insulina. Este fenómeno observado exclusivamente en el grupo fructosa podría ser debido a que solamente en este grupo de tratamiento los niveles de la proteína IRS2 se encontraron disminuidos de manera significativa.

Estos resultados demuestran cómo una ingesta de fructosa, pero no así de glucosa, afecta a la vía insulina/Akt en el hígado.

Tejido muscular esquelético

Se analizó también el efecto del consumo de fructosa o glucosa sobre el tejido muscular, sensible también a la señalización por insulina. Es importante destacar cómo en condiciones basales el grado de fosforilación de la proteína AS160 (*Akt substrate of 160 kDa*), tanto en el grupo fructosa como en el grupo glucosa, se encontró significativamente disminuido, a pesar de que en ambos grupos se detectó una hiperinsulinemia en condiciones basales.

Se analizaron marcadores relacionados con resistencia a la insulina en este tejido, como es el caso de los genes que codifican para las proteínas DGAT1 (*diacylglycerol acyltransferase-1*) y mt-co1 (*mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I*). La proteína DGAT1 participa en la síntesis de DAG y está implicada en el desarrollo de resistencia a la insulina en músculo (Jornayvaz y col., 2010). En el presente estudio, las ratas no estimuladas con insulina exógena presentaban los mismos niveles de mRNA de este marcador en los tres grupos de estudio. Con respecto a mt-co1, se trata de un marcador mitocondrial, cuya disminución está relacionada con resistencia a la insulina. Se analizaron los niveles de mRNA de este marcador y las ratas del grupo fructosa presentaban un ligero aumento del 24% con respecto a las ratas control, aunque éste no fue significativo.

A la hora de estudiar en tejido muscular el efecto del consumo de fructosa o de glucosa tras una estimulación con insulina exógena se observó que, a diferencia de lo que ocurría en hígado, la vía de Akt en el tejido muscular se estimulaba de manera similar en los tres grupos de tratamiento. Sin embargo, al analizar la proteína AS160 (*Akt substrate of 160 kDa*), diana de Akt, se observó cómo tras esta estimulación con insulina exógena, únicamente el grupo fructosa no presentaba un aumento significativo en la fosforilación de dicha proteína. Estos datos sugieren que en el grupo fructosa, a pesar de que la vía de la insulina funciona correctamente hasta llegar a la fosforilación de Akt, existe algún impedimento en la fosforilación de AS160 que podría reducir la translocación de GLUT4. Por tanto, en este grupo de tratamiento se produciría una menor captación de glucosa plasmática por parte del tejido muscular esquelético, explicando así el aumento de glucemia observado en el grupo fructosa en el test de tolerancia a la glucosa.

Este resultado podría indicar que tanto el consumo de fructosa como el de glucosa, podrían alterar el proceso de translocación de vesículas de GLUT4, aunque se observa que en el grupo fructosa esta alteración es mucho más evidente, sobre todo tras una estimulación con insulina exógena. Sin embargo, la fosforilación de AS160 es una manera indirecta de demostrar el estado de la translocación de GLUT4. En este punto, sería necesario el análisis de la cantidad de transportador GLUT4 presente en la membrana plasmática de las células musculares de los tres grupos de estudio, con el fin de poder sacar unas conclusiones más contundentes sobre el efecto que la ingesta de fructosa o glucosa produce sobre la translocación de GLUT4. Así, un estudio de Li y colaboradores (2008) demuestra cómo una dieta rica en fructosa disminuye la fosforilación de Akt en el músculo esquelético de ratas, lo que comporta un descenso en la translocación de GLUT4.

Para complementar los resultados obtenidos en el tejido muscular, se decidió realizar un estudio con células musculares esqueléticas de origen murino (C₂C₁₂) a las que también se les estimuló con insulina exógena, mimetizando así la administración realizada en los animales. Se observó cómo, al igual que ocurría en muestras de tejido, la fosforilación de Akt tras la estimulación con insulina presentaba la misma magnitud en el grupo control y en el grupo fructosa, incluso en aquellas células en las que se había eliminado la glucosa del medio para forzar a que la fructosa suplementada en el medio fuese la única fuente de energía. Hubiese sido interesante analizar el grado de fosforilación del siguiente paso en la señalización por Akt en este tipo de células, la fosforilación de AS160, con el fin de comprobar si estas células en cultivo se comportaban igual que las células del tejido, en las que el grupo fructosa presentaba un menor grado de fosforilación de AS160. Sin embargo, en el presente trabajo no se pudieron obtener resultados satisfactorios al respecto.

Al analizar la expresión de marcadores de la captación y del metabolismo de la fructosa en estas células, como es el caso de los genes que codifican para las proteínas GLUT5 y fructocinasa, se observó cómo las células suplementadas con fructosa presentaban los mismos niveles de mRNA de estos marcadores que las células control, por lo que en este modelo experimental la fructosa no induce un incremento en la expresión de proteínas que participan en su metabolismo.

Tejido adiposo visceral

Finalmente, se procedió al estudio del efecto de una suplementación con fructosa o glucosa sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos en el tejido adiposo visceral. En este caso, la estimulación con insulina exógena produjo unos resultados muy similares a los obtenidos en hígado, ya que se observó cómo tras esta estimulación se producía un aumento en la fosforilación de Akt en los grupos control y glucosa, pero no así en el grupo fructosa. Una de las funciones de la insulina en el tejido adiposo es su capacidad de reducir la lipólisis, para dar paso a la lipogénesis. Una disminución en la vía de señalización de Akt por parte de las ratas del grupo fructosa implica, en nuestro modelo experimental, una menor reducción de la lipólisis, tal y como muestra el aumento en los niveles de ácidos grasos libres (NEFAs) en plasma en este grupo tras la estimulación con insulina exógena.

Todos estos datos obtenidos tras el análisis de los tres tejidos sensibles a la acción de la insulina ponen de manifiesto la capacidad exclusiva que presente la fructosa de inducir alteraciones relacionadas con la homeostasis de la glucosa. Efectivamente, en los tres tejidos observamos cómo la fructosa produce un déficit en la señalización dependiente de Akt, que tiene consecuencias metabólicas dependiendo del órgano, pero que todas ellas conllevan a un cuadro de resistencia a la insulina en el organismo. Nuestros resultados también indicarían que, en el caso de las alteraciones observadas en el test de tolerancia a la glucosa, probablemente el músculo esquelético sea el principal responsable del incremento en las concentraciones de glucosa en plasma en los animales suplementados con fructosa, ya que éste órgano se encarga de la captación de hasta el 75% de la glucosa circulante en plasma (Klip y Paquet, 1990).

Con respecto a la suplementación de glucosa, los resultados del presente trabajo muestran cómo una ingesta de este carbohidrato durante 56 días comienza a tener efectos sobre algunas vías del metabolismo de carbohidratos y lípidos, si bien este efecto no es tan severo como el observado tras una suplementación isocalórica de fructosa. Los datos más evidentes que demuestran esta conclusión son los obtenidos en el test de tolerancia a la glucosa y la curva de insulina, donde se aprecia un aumento de la hiperinsulinemia en el experimento (tal y como ocurre también en el grupo fructosa), pero que es capaz de normalizar los valores de la curva de glucosa. Otro ejemplo es el obtenido en el aumento del grado de fosforilación de Akt en el tejido adiposo tras un estímulo con insulina exógena. Probablemente, un tiempo de suplementación más prolongado induciría en el hígado de los animales del grupo glucosa unos efectos más evidentes sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos, tal y como ocurre en el grupo fructosa.

5) Otras consideraciones: Efecto de las horas de ayuno sobre algunos marcadores de interés

En el presente trabajo se han observado diferencias en algunos de los marcadores analizados como resultado de distintas horas de ayuno. Las ratas del estudio 1 permanecieron 2 horas en ayuno, mientras que las ratas del estudio 2 estuvieron 12 horas, ya que era necesario este tiempo de ayuno para la posterior administración de insulina intraperitoneal. Esta diferencia en el tiempo de ayuno antes del sacrificio hizo que se obtuvieran diferencias en los niveles de expresión de algunos marcadores de interés.

La mayoría de estos marcadores hacen referencia a proteínas capaces de regular la actividad de FoxO1. Es el caso de las cinasas SGK y PKA. En el estudio 1, las ratas suplementadas con fructosa presentaban un grado de fosforilación de SGK en su residuo Ser⁴²² superior a las ratas del grupo control. Este efecto de la ingesta de fructosa desaparecía en el estudio 2, por lo que queda en evidencia el efecto del ayuno sobre la fosforilación de esta cinasa. Un fenómeno similar ocurre con la proteína PKA. En las ratas del estudio 2 se pudo detectar el nivel de fosforilación de PKA, a pesar de que no se observaran cambios entre los tres grupos experimentales. Sin embargo, la detección de este nivel de fosforilación en las ratas del grupo 1 resultó imposible, seguramente debido al poco tiempo de ayuno que presentaban estos animales. Éstos fueron sacrificados tras 2 horas de ayuno, tiempo insuficiente como para que se genere suficiente glucagón, responsable de la activación por fosforilación de PKA (Kahn, 1998).

Otra proteína que podría estar bajo control del tiempo de ayuno es MKP-3, una fosfatasa que elimina grupos fosfato de FoxO1. En las ratas del estudio 1 se observó cómo una suplementación con fructosa disminuía los niveles de esta proteína, lo que podría explicarnos el aumento en la fosforilación de FoxO1. Sin embargo, en las ratas del estudio 2, los niveles de MKP-3 no se vieron modificados (ni en el grupo fructosa ni en el grupo glucosa), por lo que en este segundo estudio esta proteína no participaría en la inactivación de FoxO1.

Otro marcador influenciado por el tiempo de ayuno es la hormona FGF21 (*fibroblast growth factor*). En periodos de ayunas, este factor es capaz de promover la lipólisis, la β -oxidación, o la cetogénesis, lo que indica que FGF21 es un regulador importante en la homeostasis lipídica como mecanismo adaptador a la deprivación de nutrientes (Kim y col., 2015). En el presente trabajo, se observó cómo el tiempo de ayuno es importante en la secreción de esta hormona. Así, al comparar los niveles de FGF21 de los animales del grupo control en ambos estudios, se observa cómo los controles del estudio 2, que se encontraban más horas en ayuno, presentaban unos valores plasmáticos mucho más elevados de FGF21 que los controles del estudio 1. Ya que en situaciones de ayuno la hormona FGF21 es capaz de inducir la expresión de enzimas responsables de la cetogénesis (Kim y col., 2015), estos resultados podrían indicar que los tejidos sensibles al efecto de esta hormona de las ratas con mayor tiempo de ayuno obtendrían la energía a partir de cuerpos cetónicos, ante una escasez de glucosa plasmática.

VI. DISCUSIÓN

La proteína GPR119, relacionada con la oxidación de lípidos a nivel de tejido muscular, parece que también sufre una regulación dependiente de las horas de ayuno. Así, en las ratas del estudio 1 se observa un aumento significativo de esta proteína tras una suplementación con fructosa, fenómeno que desaparece en el segundo estudio al ampliar las horas de ayuno. Estos datos indicarían que con pocas horas de ayuno, el músculo de las ratas fructosa es incapaz de obtener energía a partir de la oxidación de ácidos grasos.

VII. CONCLUSIONES

A partir del presente trabajo se obtienen las siguientes conclusiones:

1. La suplementación subcrónica (56 días) de la dieta con un 10% de fructosa (p/v) en el agua de bebida en ratas Sprague-Dawley hembra provoca la aparición de hipertrigliceridemia y esteatosis hepática, debido a la inducción de la expresión de enzimas lipogénicos de una manera dependiente de ChREBP y a la reducción de la β -oxidación de los ácidos grasos en el hígado, probablemente como consecuencia de un descenso en la actividad autofágica.
2. El descenso en la actividad autofágica en el hígado de ratas suplementadas con fructosa líquida es debido a la activación de la proteína mTOR, y dependiente de Ulk1. La inhibición de la proteína TSC1/2 parece ser la responsable de esta activación de mTOR.
3. En nuestro modelo experimental, la ingesta de fructosa líquida durante un periodo subcrónico no es suficiente como para activar la respuesta UPR en el retículo endoplasmático, así como tampoco de inducir inflamación y estrés oxidativo en el hígado y en el tejido adiposo, ya sea debido a un aumento en la permeabilidad intestinal a las endotoxinas o como consecuencia del contenido lipídico en estos tejidos.
4. La suplementación de la dieta, ya sea con fructosa o con glucosa al 10% (p/v) en el agua de bebida, induce hiperinsulinemia y disminución de los genes gluconeogénicos a nivel hepático; pero en condiciones isocalóricas, únicamente la ingesta de fructosa es capaz de producir una alteración en la curva de la glucemia tras un test de tolerancia a la glucosa.
5. Como consecuencia de esta alteración en la curva de la glucemia, la ingesta de fructosa es capaz de inducir efectos adversos sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos en los tres principales tejidos sensibles a la insulina:
 - En condiciones isocalóricas, únicamente la suplementación subcrónica de fructosa es capaz de disminuir los niveles hepáticos de IRS2, que implica una alteración en la vía de señalización de la insulina dependiente de Akt.
 - En condiciones isocalóricas, únicamente la suplementación subcrónica de fructosa es capaz de producir un descenso en la señalización de la vía de la insulina dependiente de Akt en el tejido adiposo, que tiene como consecuencia una menor reducción en la lipólisis en este tejido.
 - La ingesta de fructosa, pero no así la de glucosa, es capaz de producir un descenso en la fosforilación de AS160 en músculo esquelético tras una estimulación con insulina, lo que dificultaría la captación de glucosa por parte de este tejido. Así, el músculo parecer ser el principal responsable de la alteración en la homeostasis de la glucosa observada en las ratas fructosa durante el test de tolerancia a la glucosa.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

A

- Álvarez Gómez, A., Rosales, L. C., Rodríguez, G. P. (2012). *Consumo elevado de fructosa y su posible influencia sobre el metabolismo lipídico*. Rev Cubana Aliment Nutr, 22(2), 287–300.
- Abdel-Sayed, A., Binnert, C., Lê, K. A., Bortolotti, M., Schneiter, P., Tappy, L. (2008). *A high-fructose diet impairs basal and stress-mediated lipid metabolism in healthy male subjects*. The British Journal of Nutrition, 100(2), 393–399.
- Abdelmalek, M. F., Suzuki, A., Guy, C., Unalp-Arida, A., Colvin, R., Johnson, R. J., Diehl, A. M. (2010). *Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with NAFLD*. Hepatology, 51(6), 1961–1971.
- Ahmed, A., Saksena, S., Sherlock, M., Olliff, S. P., Elias, E., Stewart, P.M. (2008). *Induction of hepatic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in patients with alcoholic liver disease*. Clin Endocrinol (Oxf). 2008 Jun;68(6):898-903.
- Aijälä, M., Malo, E., Ukkola, O., Bloigu, R., Lehenkari, P., Autio-Harmainen, H., Kesäniemi, Y. A. (2013). *Long-term fructose feeding changes the expression of leptin receptors and autophagy genes in the adipose tissue and liver of male rats: A possible link to elevated triglycerides*. Genes and Nutrition, 8(6), 623–635.
- Alegret, M., Roglans, N., Laguna, J.C. (2011). *Fructose consumption and leptin resistance: what have we learnt from animal studies?* RM Hemling & AT Belkin (Eds.), Leptin: Hormonal Functions, Dysfunctions and Clinical Uses (pp. 209-230).
- Ameer, F., Scanduzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., Zaidi, N. (2014). *De novo lipogenesis in health and disease*. Metabolism: Clinical and Experimental, 63(7), 895–902.
- Amir, M., Czaja, M. J. (2011). *Autophagy in nonalcoholic steatohepatitis*. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology, 5(2), 159–166.
- Aranceta, J., Foz, M., Gil, B., Jover, E., Mantilla, T., Millán, J., Monereo, S., Moreno, B. (2003). *Documento de consenso: obesidad y riesgo cardiovascular*. Clin Invest Arterioscl 15, 196-233.
- Armoni, M., Harel, C., Bar-Yoseph, F., Milo, S., Karnieli, E. (2005). *Free fatty acids repress the GLUT4 gene expression in cardiac muscle via novel response elements*. Journal of Biological Chemistry, 280(41), 34786–34795.
- Azzout-Marniche, D., Becard, D., Guichard, C., Foretz, M., Ferre, P., Foufelle, F. (2000). *Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes*. Biochem. J. 350 Pt 2, 389-393.

B

Bantle, J. P., Raatz, S. K., Thomas, W., Georgopoulos, A. (2000). *Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects*. Am J Clin Nutr, 72, 1128–1134.

Basciano, H., Federico, L., Adeli, K. (2005). *Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia*. Nutrition & Metabolism, 2, 5.

Baus, D., Heermeier, K., De Hoop, M., Metz-Weidmann, C., Gassenhuber, J., Dittrich, W., Tennagels, N. (2008). *Identification of a novel AS160 splice variant that regulates GLUT4 translocation and glucose-uptake in rat muscle cells*. Cellular Signalling, 20(12), 2237–2246.

Benhamed, F., Denechaud, P. D., Lemoine, M., Robichon, C., Moldes, M., Bertrand-Michel, J., Postic, C. (2012). *The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans*. Journal of Clinical Investigation, 122(6), 2176–2194.

Bergheim, I., Weber, S., Vos, M., Krämer, S., Volynets, V., Kaserouni, S., Bischoff, S. C. (2008). *Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: Role of endotoxin*. Journal of Hepatology, 48(6), 983–992.

Birjmohun, R. S., Hutten, B. A., Kastelein, J. J. P., Stroes, E. S. G. (2005). *Efficacy and safety of high-density lipoprotein cholesterol-increasing compounds: A meta-analysis of randomized controlled trials*. Journal of the American College of Cardiology, 45(2), 185–197.

Bjorkman, O., Gunnarsson, R., Hagstrom, E., Felig, P., Wahren, J. (1989). *Splanchnic and renal exchange of infused fructose in insulin-deficient type 1 diabetic patients and healthy controls*. Journal of Clinical Investigation, 83(1), 52–59.

Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Bray, G. A., Nielsen, S. J., Popkin, B. M. (2004). *Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity*. American Journal of Clinical Nutrition, 79(4), 537–543.

Buratta, S., Urbanellia, L., Ferrara, G., Sagini, K., Goracci, L., Emiliania, C. (2015). *A role for the autophagy regulator Transcription Factor EB in amiodarone-induced phospholipidosis*. Biochem Pharmacol. Jun 1;95(3):201-9.

Burri, L., Thoresen, G. H., Berge, R. K. (2010). *The role of PPAR α activation in liver and muscle*. PPAR Research, 2010.

C

- Chan, S. M. H., Sun, R. Q., Zeng, X. Y., Choong, Z. H., Wang, H., Watt, M. J., Ye, J. M. (2013). *Activation of PPARalpha ameliorates hepatic insulin resistance and steatosis in high fructose-fed mice despite increased endoplasmic reticulum stress*. *Diabetes*, 62(6), 2095–2105.
- Choi, S. M., Tucker, D. F., Gross, D. N., Easton, R. M., DiPilato, L. M., Dean, A. S., Birnbaum, M. J. (2010). *Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway*. *Molecular and Cellular Biology*, 30(21), 5009–5020.
- Choi, A. M. K., Ryter, S. W., Levine, B. (2013). *Autophagy in Human Health and Disease*. *New England Journal of Medicine*, 368, 651–662.
- Clément, S., Juge-Aubry, C., Sgroi, A., Conzelmann, S., Paziienza, V., Pittet-Cuenod, B., Negro, F. (2008). *Monocyte chemoattractant protein-1 secreted by adipose tissue induces direct lipid accumulation in hepatocytes*. *Hepatology*, 48(3), 799–807.
- Cnop, M., Foufelle, F., Velloso, L. A. (2012). *Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes*. *Trends in Molecular Medicine*, 18(1), 59–68.
- Collins, Q. F., Xiong, Y., Lupo, E. G., Liu, H. Y., Cao, W. (2006). *p38 Mitogen-activated protein kinase mediates free fatty acid-induced gluconeogenesis in hepatocytes*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24336–24344.
- Cornall, L. M., Mathai, M. L., Hryciw, D. H., Simcocks, A. C., O'Brien, P. E., Wentworth, J. M., McAinch, A. J. (2013). *GPR119 regulates genetic markers of fatty acid oxidation in cultured skeletal muscle myotubes*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 365(1), 108–118.
- Couchepin, C., Lê, K. A., Bortolotti, M., da Encarnação, J., Oboni, J., Tran, C., Tappy, L. (2008). *Markedly Blunted Metabolic Effects of Fructose in Healthy Young Female Subjects*. *Diabetes Care*, 31, 2001–2003.
- Crescenzo, R., Bianco, F., Coppola, P., Mazzoli, A., Cigliano, L., Liverini, G., Iossa, S. (2015). *The effect of high-fat-high-fructose diet on skeletal muscle mitochondrial energetics in adult rats*. *Eur J Nutr*. Mar;54(2):183-92
- Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., Diehl, J.A. (2003). *Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival*. *Mol Cell Biol* 23(20):7198–7209.
- Curry, D. L. (1989). *Effects of mannose and fructose on the synthesis and secretion of insulin*. *Pancreas*, 4(1), 2–9.

D

Dávalos, A., Goedeke, L., Smibert, P., Ramírez, C. M., Warriar, N. P., Andreo, U. (2011). *miR-33a / b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling*. PNAS, 108(22), 9232–9237.

Dekker, M. J., Su, Q., Baker, C., Rutledge, A. C., Adeli, K. (2010). *Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome*. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 299(5), E685–E694.

Dentin, R., Benhamed, F., Hainault, I., Fauveau, V., Foufelle, F., Dyck, J. R. B., Postic, C. (2006). *Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice*. Diabetes, 55(8), 2159–2170.

Dentin, R., Liu, Y., Koo, S. H., Hedrick, S., Vargas, T., Heredia, J., Yates, J., Montminy, M. (2007). *Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2*. Nature. Sep 20;449(7160):366-9.

Dentin, R., Tomas-Cobos, L., Fofelle, F., Leopold, J., Girard, J., Postic, C., Ferré, P. (2012). *Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver*. J Hepatol. Jan;56(1):199-209.

Denechaud, P. D., Dentin, R., Girard, J., Postic, C. (2008). *Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance*. FEBS Lett. 582, 68-73.

Dhingra, R., Sullivan, L., Jacques, P. F., Wang, T. J., Fox, C. S., Meigs, J. B., Vasan, R. S. (2007). *Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community*. Circulation, 116(5), 480–488.

Diraison, F., Yankah, V., Letexier, D., Dusserre, E., Jones, P., Beylot, M. (2003). *Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans*. Journal of Lipid Research, 44(4), 846–853.

Dirlewanger, M., Schneiter, P., Jéquier, E., Tappy, L. (2000). *Effects of fructose on hepatic glucose metabolism in humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 279, E907–E911.

Dong, X., Park, S., Lin, X., Copps, K., Yi, X., White, M.F. (2006). *Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth*. J. Clin. Invest 116, 101-114.

Douard, V., Ferraris, R. P. (2008). *Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease*. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 295(2), E227–E237.

Duran, A., Amanchy, R., Linares, J. F., Joshi, J., Abu-Baker, S., Porollo, A., Díaz-Meco, M. T. (2011). *p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway*. Molecular Cell, 44(1), 134–146.

Düvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Alex, I., Souza, A. L., Manning, B. D. (2010). *Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1*. Molecular Cell, 39(2), 171–183.

E

- Efeyan, A., Zoncu, R., Chang, S., Gumper, I., Snitkin, H., Wolfson, R. L., Sabatini, D. M. (2013). *Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival*. Nature, 493(7434), 679–83.
- Eijkelenboom, A., Burgering, B. M. T. (2013). *FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance*. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 14(2), 83–97.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, a L., Kennedy, B. P. (1999). *Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene*. Science (New York, N.Y.), 283(5407), 1544–1548.
- Elliott, S. S., Keim, N. L., Stern, J. S., Teff, K., Havel, P. J. (2002). *Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome*. Am. J. Clin. Nutr. 76, 911-922.
- Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Sawka-Verhelle, D., Hilton, D., Van Obberghen, E. (2000). *SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling*. Journal of Biological Chemistry, 275(21), 15985–15991.
- Ervin, R. B., Ogden, C. L. (2013). *Consumption of added sugars among U.S. adults, 2005-2010*. NCHS Data Brief, (122), 1–8.
- Escolà-Gil, J. C., Julve, J., Marzal-Casacuberta, a, Ordóñez-Llanos, J., González-Sastre, F., Blanco-Vaca, F. (2000). *Expression of human apolipoprotein A-II in apolipoprotein E-deficient mice induces features of familial combined hyperlipidemia*. Journal of Lipid Research, 41(8), 1328–1338.

F

- Faeh, D., Minehira, K., Schwarz, J. M., Periasami, R., Seongsu, P., Tappy, L. (2005). *Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men*. Diabetes, 54(7), 1907–1913.
- Ferré, P., Foufelle, F. (2010). *Hepatic steatosis: A role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 12(SUPPL. 2), 83–92.
- Foretz, M., Pacot, C., Dugail, I., Lemarchand, P., Guichard, C., Le Lièpvre, X., Foufelle, F. (1999). *ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose*. Molecular and Cellular Biology, 19(5), 3760–3768.
- Foster-Powell, K., Holt, S. H., Brand Miller, J. C. (2002). *International table of glycemic index and glycemic load*. Am J Clin Nutr, 76(2), 5–56.
- Foster, K. G., Fingar, D. C. (2010). *Mammalian target of rapamycin (mTOR): Conducting the cellular signaling symphony*. Journal of Biological Chemistry, 285(19), 14071–14077.

Franz, M., Bantle, J., Beebe, C., Brunzell, J., Chiasson, J. (2002). *Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes*. Nutrition in Clinical Care: An Official Publication of Tufts University, 6(3), 115–119.

Frescas, D., Valenti, L., Accili, D. (2005). *Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes*. Journal of Biological Chemistry, 280(21), 20589–20595.

Fujii, N., Boppart, M. D., Dufresne, S. D., Crowley, P. F., Jozsi, A. C., Sakamoto, K., Goodyear, L. J. (2004). *Overexpression or ablation of JNK in skeletal muscle has no effect on glycogen synthase activity*. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 287(1), C200–C208.

Fukuchi, S., Hamaguchi, K., Seike, M., Himeno, K., Sakata, T., Yoshimatsu, H. (2004). *Role of fatty acid composition in the development of metabolic disorders in sucrose-induced obese rats*. Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.), 229(6), 486–493.

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. 2004; 114(12):1752–1761.

G

Gaby, M., Alan, R. (2005). *Adverse effects of dietary fructose*. Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic, 10(4), 294–306.

Galipeau, D., Verma, S., McNeill, J. H. (2002). *Female rats are protected against fructose-induced changes in metabolism and blood pressure*. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 283(6), H2478–H2484.

Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J. T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S.-H., Mostoslavsky, R., Puigserver, P. (2007). *Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha*. The EMBO Journal, 26(7), 1913–1923.

Ghosh, H. S., McBurney, M., Robbins, P. D. (2010). *SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin*. PLoS ONE, 5(2), 1–8.

Gingras, A., Kennedy, S. G., Leary, M. A. O., Sonenberg, N., Hay, N. (1998). *4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt (PKB) signaling pathway*. Genes & Development, 12(4), 502–513.

Glimcher, L., Lee, A. (2009). *From sugar to Fat*. Ann N Y Acad Sci, 1173(Suppl 1), E2–E9.

Goedeke, L., Vales-Lara, F. M., Fenstermaker, M., Cirera-Salinas, D., Chamorro-Jorganes, A., Ramírez, C. M., Fernández-Hernando, C. (2013). *A regulatory role for microRNA 33* in controlling lipid metabolism gene expression*. Molecular and Cellular Biology, 33(11), 2339–52.

- Goran, M. I., Dumke, K., Bouret, S. G., Kayser, B., Walker, R. W., Blumberg, B. (2013). *The obesogenic effect of high fructose exposure during early development*. Nature Reviews. Endocrinology, 9(8), 494–500.
- Grabacka, M., Pierzchalska, M., Reiss, K. (2013). *Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha ligands as anticancer drugs targeting mitochondrial metabolism*. Curr Pharm Biotechnol. March 1; 14(3): 342–356.
- Gross, L. S., Li, L., Ford, E. S., Liu, S. (2004). *Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment*. Am J Clin Nutr. May;79(5):774-9.
- Grundey, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., Costa, F. (2005). *Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement*. Circulation, 112(17), 2735–2752.
- Gutiérrez, J. A., Gómez, J. A., Gómez, A., Rubio, M. A., Cancelas, P., Jurado, C. (2011). *DRECE 1990-2010*. Med Clin Monogr (Barc), 12:1-39.

H

- Haas, J. T., Biddinger, S. B. (2009). *Dissecting the role of insulin resistance in the metabolic syndrome*. Current Opinion in Lipidology, 20(3), 206–210.
- Han, H., Choi, D., Choi, S., Koo, S. (2014). *Roles of Protein Arginine Methyltransferases in the Control of Glucose Metabolism*. Endocrinol Metab, 29, 435–440.
- Havel, P.J. (2005). *Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism*. Nutr. Rev. 63, 133-157.
- Helenius, M., Hänninen, M., Lehtinen, S.K., Salminen, A. (1996). *Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NFκB transcription factor in mouse cardiac muscle*. J. Mol. Cell. Cardiol. 28 (1996) 487–498.
- Herman, M. A., Peroni, O. D., Villoria, J., Schön, M. R., Abumrad, N. A., Blüher, M., Klein, S., Kahn, B. (2012). *A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism*. Nature. 2012 April 19; 484(7394): 333–338.
- Horike, N., Takemori, H., Katoh, Y., Doi, J., Min, L., Asano, T., Okamoto, M. (2003). *Adipose-specific expression, phosphorylation of Ser794 in insulin receptor substrate-1, and activation in diabetic animals of salt-inducible kinase-2*. Journal of Biological Chemistry, 278(20), 18440–18447.
- Hosseini-Esfahani, F., Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Hosseinpour-Niazi, S., Hosseinpanah, F., Azizi, F. (2011). *Dietary fructose and risk of metabolic syndrome in adults: Tehran Lipid and Glucose study*. Nutrition & Metabolism, 8(1), 50.

Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Yamashita, S. (2000). *Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1595-1599.

Hu, F. B., Malik, V. S. (2010). *Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence*. *Physiology & Behavior*, 100(1), 47–54.

Huang, D., Dhawan, T., Young, S., Yong, W. H., Boros, L. G., Heaney, A. P. (2011). *Fructose impairs glucose-induced hepatic triglyceride synthesis*. *Lipids in Health and Disease*, 10(1), 20.

Huang, R., Xu, Y., Wan, W., Shou, X., Qian, J., You, Z., Liu, B., Chang, C., Zhou, T., Lippincott-Schwartz, J., Liu, W. (2015). *Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation*. *Mol Cell*, Feb 5;57(3):456-66.

Hudgins, L. C., Seidman, C. E., Diakun, J., Hirsch, J. (1998). *Human fatty acid synthesis is reduced after the substitution of dietary starch for sugar*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67(4), 631–639.

I

Imai, S. (2011). *Dissecting Systemic Control of Metabolism and Aging in the NAD World: The Importance of SIRT1 and NAMPT-mediated NAD Biosynthesis*. *FEBS Lett*, June(6), 1657–1662.

Ip, E., Farrell, G. C., Robertson, G., Hall, P., Kirsch, R., Leclercq, I. (2003). *Central role of PPAR α -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice*. *Hepatology*, 38(1), 123–132.

Iynedjian, P. B. (1993). *Mammalian glucokinase and its gene*. *Biochemical Journal*, 293 (Pt 1), 1–13.

J

Jalal, D. I., Smits, G., Johnson, R. J., Chonchol, M. (2010). *Increased fructose associates with elevated blood pressure*. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 21(9), 1543–1549.

Jameel, F., Phang, M., Wood, L. G., Garg, M. L. (2014). *Acute effects of feeding fructose, glucose and sucrose on blood lipid levels and systemic inflammation*. *Lipids in Health and Disease*, 13, 195.

Jensen, M. D. (2008). *Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(11 Suppl 1), S57–S63.

Jiao, P., Feng, B., Li, Y., He, Q., Xu, H. (2013). *Hepatic ERK activity plays a role in energy metabolism*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 375(1-2), 157–166.

Johnson, R. J., Segal, M. S., Sautin, Y., Nakagawa, T., Feig, D. I., Kang, D. H., Sánchez-Lozada, L. G. (2007). *Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease*. The American Journal of Clinical Nutrition, 86(4), 899–906.

Johnson, R. K., Appel, L. J., Brands, M., Howard, B. V., Lefevre, M., Lustig, R. H., Wylie-Rosett, J. (2009). *Dietary Sugars Intake and Cardiovascular Health: a scientific statement from the american heart association*. Circulation, 120(11), 1011-1020.

Johnson, R. J., Perez-Pozo, S. E., Sautin, Y. Y., Manitius, J., Sánchez-Lozada, L. G., Feig, D. I., Nakagawa, T. (2009). *Hypothesis: Could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes?* Endocrine Reviews, 30(1), 96–116.

Johnson, R. J., Nakagawa, T., Sanchez-Lozada, L. G., Shafiu, M., Sundaram, S., Le, M., Lanasa, M. A. (2013). *Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity*. Diabetes, 62(10), 3307–3315.

Jornayvaz, F. R., Samuel, V. T., Shulman, G. I. (2010). *The role of muscle insulin resistance in the pathogenesis of atherogenic dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease associated with the metabolic syndrome*. Annual Review of Nutrition, 30(28), 273–290.

Joven, J., Rull, A., Ferré, N., Escolà-Gil, J.C., Marsillach, J., Coll, B., Alonso-Villaverde, C., Aragonés, G., Claria, J., Camps, J. (2007). *The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: the influence of diet and strain*. Atherosclerosis. Dec;195(2):e85-92.

K

Kammoun, H. L., Chabanon, H., Hainault, I., Luquet, S., Magnan, C., Koike, T., Foufelle, F. (2009). *GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP1c activation and reduces hepatic steatosis in mice*. The Journal of Clinical Investigation, 119(5), 1201–1215.

Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kasuga, M. (2006). *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. Journal of Clinical Investigation, 116(6), 1494–1505.

Karlsson, H. K. R., Zierath, J. R., Kane, S., Krook, A., Lienhard, G. E., Wallberg-henriksson, H. (2005). *Insulin-Stimulated Phosphorylation of the Akt Substrate Diabetic Subjects*. Diabetes, 54(June), 1692–1697.

Kato, H., Nakajima, S., Saito, Y., Takahashi, S., Katoh, R., Kitamura, M. (2012). *mTORC1 serves ER stress-triggered apoptosis via selective activation of the IRE1-JNK pathway*. Cell Death Differ. Feb;19(2):310-20

Kawaguchi, T., Takenoshita, M., Kabashima, T., Uyeda, K. (2001). *Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(24), 13710–13715.

Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T., Uyeda, K. (2002). *Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrateresponsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase*. J. Biol. Chem. 277, 3829-3835.

Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., Wraahli, W. (1999). *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting*. Journal of Clinical Investigation, 103(11), 1489–1498.

Kersten, S. (2001). *Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis*. EMBO Reports, 2(4), 282–286.

Kahn, A. (1998). From the glycogenic function of the liver to gene regulation by glucose. C R Seances Soc Biol Fil. 1998;192(5):813-27.

Khan, A. H., Pessin, J. E. (2002). *Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways*. Diabetologia, 45(11), 1475–1483.

Kim, J. Y., Hickner, R. C., Cortright, R. L., Dohm, G. L., Houmard, J. A. (2000). *Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle*. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 279(5), E1039–E1044.

Kim, J. K., Kim, Y. J., Fillmore, J. J., Chen, Y., Moore, I., Lee, J., Shulman, G. I. (2001). *Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate*. Journal of Clinical Investigation, 108(3), 437–446.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., Guan, K. L. (2011). *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. Nature Cell Biology, 13(2), 132–141.

Kim, J. E., Leite, J. O., DeOgburn, R., Smyth, J. A., Clark, R. M., Fernández, M. L. (2011). *A lutein-enriched diet prevents cholesterol accumulation and decreases oxidized LDL and inflammatory cytokines in the aorta of guinea pigs*. The Journal of Nutrition, 141(8), 1458–1463.

Kim, S. G., Hoffman, G. R., Pouligiannis, G., Buel, G. R., Jang, Y. J., Lee, K. W., Blenis, J. (2013). *Metabolic stress controls mTORC1 lysosomal localization and dimerization by regulating the TTT-RUVBL1/2 complex*. Molecular Cell, 49(1), 172–185.

Kim, S. H., Kim, K. H., Kim, H. K., Kim, M. J., Back, S. H., Konishi, M., Lee, M. S. (2015). *Fibroblast growth factor 21 participates in adaptation to endoplasmic reticulum stress and attenuates obesity-induced hepatic metabolic stress*. Diabetologia, 58(4), 809–18.

Klionsky, D. J., Abdalla, F. C., Abeliovich, H., Abraham, R. T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Zuckerbraun, B. (2012). *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy*. Autophagy, 8(4), 445–544.

- Klip, A., Paquet, M. R. (1990). Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* 13, 228–243.
- Kobayashi, T., Cohen, P. (1999). *Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2*. *Biochemical Journal*, 339, 319–328.
- Koo, S. H., Dutcher, A. K., Towle, H. C. (2001). *Glucose and insulin function through two distinct transcription factors to stimulate expression of lipogenic enzyme genes in liver*. *J. Biol. Chem.* 276, 9437-9445.
- Koo, H. Y., Miyashita, M., Cho, B. H., Nakamura, M. T. (2009). *Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 285-289.
- Korotkova, M., Lundberg, I. E. (2014). *The skeletal muscle arachidonic acid cascade in health and inflammatory disease*. *Nature Reviews Rheumatology* 10, 295–303.
- Kowala, M.C., Recce, R., Beyer, S., Gu, C., Valentine, M. (2000). *Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE*. *Atherosclerosis*. 2000 Apr;149(2):323-30.

L

- Laplante, M., Sabatini, D. M. (2009). *mTOR signaling at a glance*. *Journal of Cell Science*, 122, 3589–3594.
- Laugerette, F., Vors, C., Peretti, N., Michalski, M. C. (2011). *Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation*. *Biochimie*, 93(1), 39–45.
- Lavallard, V. J., Meijer, A. J., Codogno, P., Gual, P. (2012). *Autophagy, signaling and obesity*. *Pharmacological Research*, 66(6), 513–525.
- Lazarow, P.B. (1981). *Assay of peroxisomal beta-oxidation of fatty acids*. *Methods Enzymol.* 72, 315–319.
- Lê, K.A., Tappy, L. (2006). *Metabolic effects of fructose*. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 9(4), 469–475.
- Le, M. T., Frye, R. F., Rivard, C. J., Cheng, J., McFann, K. K., Segal, M. S., Johnson, J. A. (2012). *Effects of high-fructose corn syrup and sucrose on the pharmacokinetics of fructose and acute metabolic and hemodynamic responses in healthy subjects*. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 61(5), 641–651.

- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Kaufman, R. J. (2002). *IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response*. *Genes and Development*, 16(4), 452–466.
- Lee, I. H., Cao, L., Mostoslavsky, R., Lombard, D. B., Liu, J., Bruns, N. E., Finkel, T. (2008). *A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), 3374–3379.
- Lee, A. H., Scapa, E. F., Cohen, D. E., Glimcher, L. (2008). *Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1*. *Science*, 320(5882), 1492–1496.
- Lee, M. N., Ha, S. H., Kim, J., Koh, A., Lee, C. S., Kim, J. H., Ryu, S. H. (2009). *Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of Rheb*. *Molecular and Cellular Biology*, 29(14), 3991–4001.
- Lee, J. W., Chen, H., Pullikotil, P., Quon, M. J. (2011). *Protein kinase A-alpha directly phosphorylates FoxO1 in vascular endothelial cells to regulate expression of vascular cellular adhesion molecule-1 mRNA*. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6423–6432.
- Li, Y., Inoki, K., Vacratsis, P., Guan, K. L. (2003). *The p38 and MK2 kinase cascade phosphorylates tuberin, the tuberous sclerosis 2 gene product, and enhances its interaction with 14-3-3*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 13663–13671.
- Li, P., Koike, T., Qin, B., Kubota, M., Kawat, Y., Jia, Y. J., Oshida, Y. (2008). *A High-fructose Diet Impairs Akt and PKCζ Phosphorylation and GLUT4 Translocation in Rat Skeletal Muscle*. *Horm Metab Res* 2008; 40(8): 528-532.
- Liao, J., Barthel, A., Nakatani, K., Roth, R. A. (1998). *Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), 27320–27324.
- Lim, J. S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J. M., Lustig, R. H. (2010). *The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome*. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 251-264.
- Lin, C.H., Zhang, H., Li, M., Xiong, X., Chen, X., Chen, X., Dong X.C., Yin, X. M. (2013). *Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice*. *J Hepatol.* 2013 May;58(5):993-9.
- Lippai, M., Low, P. (2014). *The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy*. *BioMed Research International*, 2014.
- Lipson, K. L., Ghosh, R., Urano, F. (2008). *The role of IRE1α in the degradation of insulin mRNA in pancreatic β-cells*. *PLoS ONE*, 3(2), 1–7.
- Liu, M., Chung, S., Shelness, G., Parks, J. (2012). *Hepatic ABCA1 and VLDL triglyceride production*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821(5), 770–777.

Liu, K., Czaja, M. J. (2013). *Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy*. Cell Death and Differentiation, 20(1), 3–11.

Lopaschuk, G., Ussher, J., Folmes, C., Jaswal, J., Stanley, W. (2010). *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease*. Physiological Rev, 90, 207–258.

Lustig, R.H. (2010). *Fructose: metabolic, hedonic, and societal parallels with ethanol*. J. Am. Diet. Assoc. 110, 1307-1321.

M

Maeda, N., Funahashi, T., Shimomura, I. (2008). *Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9*. Nature Clinical Practice. Endocrinology & Metabolism, 4(11), 627–634.

Magnuson, B., Ekim, B., Fingar, D.C. (2012). *Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks*. Biochem J. 2012 Jan 1;441(1):1-21.

Malik, V.S., Popkin, B.M., Bray, G.A., Despres, J.P., Hu, F.B. (2010). *Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk*. Circulation 121, 1356-1364.

Mandrekar, P., Ambade, A., Lim, A., Szabo, G., Catalano, D. (2011). *An essential role for MCP-1 in alcoholic liver injury: regulation of pro-inflammatory cytokines and hepatic steatosis*. Hepatology. 2011 December ; 54(6): 2185–2197.

Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, a M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, a J., Melchionda, N. (1999). *Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance*. The American Journal of Medicine, 107(5), 450–455.

Martínez-Candela, J., Franch Nadal, J., Romero Ortiz, J., Cánovas Domínguez, C., Gallardo Martín, A., Páez Pérez, M. (2006). *Prevalence of metabolic syndrome in the adult population of Yecla (Murcia). Degree of agreement between three definitions of it*. Atencion Primaria / Sociedad Espanola de Medicina de Familia, 38(2), 72–79.

Mayes, A. (1993). *Intermediary metabolism of fructose*. Am J Clin Nutr, 58, 754S–65S.

Merat, S., Casanada, F., Sutphin, M., Palinski, W., Reaven, P. D. (1999). *Western-type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 19(5), 1223–1230.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., Klionsky, D. J. (2008). *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. Nature, 451(7182), 1069–1075.

Mudau, M., Genis, A., Lochner, A., Strijdom, H. (2012). *Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis*. Cardiovascular Journal of Africa, 23(4), 222–231.

Mueckler, M., Thorens, B. (2013). *The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters*. Molecular Aspects of Medicine, 34(2-3), 121–138.

Munshi, A., Ramesh, R. (2013). *Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Radiation Response*. Genes & Cancer 4 (9-10) 401-408.

N

Nagai, Y., Nishio, Y., Nakamura, T., Maegawa, H., Kikkawa, R., Kashiwagi, A. (2002). *Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α* . American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 282(5), E1180–E1190.

Nagata, R., Nishio, Y., Sekine, O., Nagai, Y., Maeno, Y., Ugi, S., Kashiwagi, A. (2004). *Single nucleotide polymorphism (-468 Gly to Ala) at the promoter region of sterol regulatory element-binding protein-1c associates with genetic defect of fructose-induced hepatic lipogenesis*. Journal of Biological Chemistry, 279(28), 29031–29042.

Naito, T., Kuma, A., Mizushima, N. (2013). *Differential contribution of insulin and amino acids to the mtorc1-autophagy pathway in the liver and muscle*. Journal of Biological Chemistry, 288(29), 21074–21081.

Nakamura, M. T., Yudell, B. E., Loor, J. J. (2014). *Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids*. Progress in Lipid Research, 53(1), 124–144.

Nakatani, Y., Kaneto, H., Kawamori, D., Hatazaki, M., Miyatsuka, T., Matsuoka, T. A., Hori, M. (2004). *Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status*. Journal of Biological Chemistry, 279(44), 45803–45809.

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y. (2009). *Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast*. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 10(7), 458–467.

Nedelsky, N., Todd, P. K., Taylor, J. P. (2008). *Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection*. Biochimica et Biophysica Acta, 1782(12), 691–699.

Nolan, C. J., Damm, P., Prentki, M. (2011). *Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management*. Lancet 378, 169-181.

O

- Ota, T., Gayet, C., Ginsberg, H. N. (2008). *Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents*. Journal of Clinical Investigation, 118(1), 316–332.
- Ouyang, X., Cirillo, P., Sautin, Y., McCall, S., Bruchette, J. L., Diehl, A. M., Abdelmalek, M. F. (2008). *Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease*. Journal of Hepatology, 48(6), 993–999.
- Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R. O., Hotamisligil, G. S. (2006). *Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes*. Science (New York, N.Y.), 313(5790), 1137–1140.

P

- Panera, N. (2014). *MicroRNAs as controlled systems and controllers in non-alcoholic fatty liver disease*. World Journal of Gastroenterology, 20(41), 15079.
- Park, J., Leong, M. L. L., Buse, P., Maiyar, A. C., Firestone, G. L., Hemmings, B. a. (1999). *Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI3-kinase-stimulated signaling pathway*. EMBO Journal, 18(11), 3024–3033.
- Parks, E. J., Krauss, R. M., Christiansen, M. P., Neese, R. A., Hellerstein, M. K. (1999). *Effects of a low-fat, high-carbohydrate diet on VLDL- triglyceride assembly, production, and clearance*. The Journal of Clinical Investigation, 104(8), 1087–1096.
- Petherick, K. J., Conway, O. J. L., Mpamhanga, C., Osborne, S. a., Kamal, A., Saxty, B., Ganley, I. G. (2015). *Pharmacological Inhibition of ULK1 Blocks mTOR-Dependent Autophagy*. Journal of Biological Chemistry, 290(18), 11376–11383.
- Pineda-Torra, I., Jamshidi, Y., Flavell, D., Fruchart, J., Staels, B. (2002). *Characterization of the Human PPARalpha Promoter: Identification of a Functional Nuclear Receptor Response Element*. Molecular Endocrinology, 16(5), 1013–1028.
- Police, S. B., Harris, J. C., Lodder, R. A., Cassis, L. A. (2009). *Effect of Diets Containing Sucrose vs. D-tagatose in Hypercholesterolemic Mice*. Obesity (Silver Spring), 17(2), 269–275.
- Postic, C., Dentin, R., Denechaud, P.-D., Girard, J. (2007). *ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism*. Annual Review of Nutrition, 27, 179–192.
- Purohit, V., Gao, B., Song, B. (2009). *Molecular Mechanisms of Alcoholic Fatty Liver*. Alcohol Clin Exp Res., 33(2), 191–205.

Purushotham, A., Schug, T. T., Xu, Q., Surapureddi, S., Guo, X., Li, X. (2009). *Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation*. *Cell Metabolism*, 9(4), 327–338.

Q

Qiu, W., Su, Q., Rutledge, A. C., Zhang, J., Adeli, K. (2009). *Glucosamine-induced endoplasmic reticulum stress attenuates apolipoprotein B100 synthesis via PERK signaling*. *Journal of Lipid Research*, 50(9), 1814–1823.

R

Raben, A., Vasilaras, T. H., Christina Møller, A., Astrup, A. (2002). *Sucrose compared with artificial sweeteners: Different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76(4), 721–729.

Rautou, P. E., Mansouri, A., Lebrec, D., Durand, F., Valla, D., Moreau, R. (2010). *Autophagy in liver diseases*. *Journal of Hepatology*, 53, 1123–1134.

Rebollo, A., Roglans, N., Baena, M., Padrosa, A., Sánchez, R. M., Merlos, M., Laguna, J. C. (2014a). *Liquid fructose down-regulates liver insulin receptor substrate 2 and gluconeogenic enzymes by modifying nutrient sensing factors in rats*. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(2), 250–258.

Rebollo, A., Roglans, N., Baena, M., Sánchez, R. M., Merlos, M., Alegret, M., Laguna, J. C. (2014b). *Liquid fructose downregulates Sirt1 expression and activity and impairs the oxidation of fatty acids in rat and human liver cells*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(4), 514–524.

Ren, L. P., Chan, S. M. H., Zeng, X. Y., Laybutt, D. R., Iseli, T. J., Sun, R. Q., Ye, J. M. (2012). *Differing endoplasmic reticulum stress response to excess lipogenesis versus lipid oversupply in relation to hepatic steatosis and insulin resistance*. *PLoS ONE*, 7(2).

Robbins, C. S., Hilgendorf, I., Weber, G. F., Theurl, I., Figueiredo, J., Gorbatov, R., Swirski, F. K. (2013). *Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis*. *Nat. Med.*, 19(9), 1166–1172.

Roberts, C. K., Vaziri, N. D., Barnard, R. J. (2001). *Protective effects of estrogen on gender-specific development of diet-induced hypertension*. *Journal of Applied Physiology*, 91(5), 2005–2009.

- Roglans, N., Sanguino, E., Peris, C., Alegret, M., Vázquez, M., Adzet, T., Sánchez, R. M. (2002). *Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 302(1), 232–239.
- Roglans, N., Vilà, L., Farré, M., Alegret, M., Sánchez, R. M., Vázquez-Carrera, M., Laguna, J. C. (2007). *Impairment of hepatic STAT-3 activation and reduction of PPAR α activity in fructose-fed rats*. Hepatology, 45(3), 778–788.
- Ruderman, N. B., Saha, A. K., Vavvas, D., Witters, L. A. (1999). *Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance*. The American Journal of Physiology, 276(1 Pt 1), E1–E18.
- Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., White, M. F. (2002). *SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2*. J. Biol. Chem. 277, 42394–42398.
- Rutledge, A.C., Adeli, K. (2007). *Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms*. Nutr Rev. 2007 Jun;65(6 Pt 2):S13–23.

S

- Saltiel, A. R., Kahn, C. R. (2001). *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 414(6865), 799–806.
- Sano, R., Reed, J. C. (2013). *ER stress-induced cell death mechanisms*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 1833(12), 3460–3470.
- Schaefer, E. J., Gleason, J. A, Dansinger, M. L. (2009). *Dietary fructose and glucose differentially affect lipid and glucose homeostasis*. The Journal of Nutrition, 139(6), 1257S–1262S.
- Schindler, A. J., Schekman, R. (2009). *In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(42), 17775–17780.
- Schinner, S., Scherbaum, W. A., Bornstein, S. R., Barthel, A. (2005). *Molecular mechanisms of insulin resistance*. Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association, 22(6), 674–682.
- Schmoll, D., Walker, K. S., Alessi, D. R., Grempler, R., Burchell, A., Guo, S., Unterman, T. G. (2000). *Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B α and the forkhead transcription factor FKHR*. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. The Journal of Biological Chemistry, 275(46), 36324–36333.
- Shimobayashi, M., Hall, M. N. (2014). *Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk*. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, 15(3), 155–62.

- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J. D., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1999). *Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(24), 13656–13661.
- Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R. E., Bashmakov, Y., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (2000). *Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice*. Molecular Cell, 6(1), 77–86.
- Sing, C. F., Davignon, J. (1985). *Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation*. American Journal of Human Genetics, 37(2), 268–285.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Czaja, M. J. (2009). *Autophagy regulates lipid metabolism*. Nature, 458(7242), 1131–1135.
- Soliman, G. A., Acosta-Jaquez, H. A., Dunlop, E. A., Ekim, B., Maj, N. E., Tee, A. R., Fingar, D. C. (2010). *mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action*. Journal of Biological Chemistry, 285(11), 7866–7879.
- Spruss, A., Kanuri, G., Wagnerberger, S., Haub, S., Bischoff, S. C., Bergheim, I. (2009). *Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice*. Hepatology, 50(4), 1094–1104.
- Stanhope, K. L., Havel, P. J. (2008). *Endocrine and metabolic effects of consuming beverages sweetened with fructose, glucose, sucrose, or high-fructose corn syrup*. American Journal of Clinical Nutrition, 88(6).
- Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Keim, N. L., Griffen, S. C., Bremer, A. A., Graham, J. L., Chiu, S. (2009). *Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increase visceral adiposity and lipids and decrease insulin sensitivity in overweight/obese men*. Journal of Clinical Investigation, 1334(5), 1322–1334.
- Stanhope, K. L., Havel, P. J. (2010). *Fructose consumption: Recent results and their potential implications*. Ann N Y Acad Sci, March(1190), 15–24.
- Su, Q., Baker, C., Christian, P., Naples, M., Tong, X., Zhang, K., Adeli, K. (2014). *Hepatic mitochondrial and ER stress induced by defective PPAR α signaling in the pathogenesis of hepatic steatosis*. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 306(11), E1264–73.
- Sutton, B. S., Weinert, S., Langefeld, C. D., Williams, A. H., Campbell, J. K., Saad, M. F., Bowden, D. W. (2005). *Genetic analysis of adiponectin and obesity in Hispanic families: The IRAS Family Study*. Human Genetics, 117(2-3), 107–118.

T

Tangirala, R. K., Rubin, E. M., Palinski, W. (1995). *Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice*. Journal of Lipid Research, 36(11), 2320–2328.

Tappy, L., Lê, K. A. (2010). *Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity*. Physiol Rev, 90: 23–46.

Teff, K. L., Elliott, S. S., Tschöp, M., Kieffer, T. J., Rader, D., Heiman, M., Havel, P. J. (2004). *Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89(6), 2963–2972.

Teff, K. L., Grudziak, J., Townsend, R. R., Dunn, T. N., Grant, R. W., Adams, S. H., Havel, P. J. (2009). *Endocrine and metabolic effects of consuming fructose- and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: Influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 94(5), 1562–1569.

Thuy, S., Ladurner, R., Volynets, V., Wagner, S., Strahl, S., Königsrainer, A., Bergheim, I. (2008). *Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake*. The Journal of Nutrition, 138(8), 1452–1455.

Tobe, K., Suzuki, R., Aoyama, M., Yamauchi, T., Kamon, J., Kubota, N., Terauchi, Y., Matsui, J., Akanuma, Y., Kimura, S., Tanaka, J., Abe, M., Ohsumi, J., Nagai, R., Kadowaki, T. (2001). *Increased expression of the sterol regulatory element-binding protein-1 gene in insulin receptor substrate-2(-/-) mouse liver*. J. Biol. Chem. 276, 38337–38340.

Tornheim, K., Lowenstein, M. (1976). *Control of Phosphofructokinase from Rat Skeletal Muscle*. The Journal of Biological Chemistry, 251(23), 7322–7328.

Tsuruzoe, K., Emkey, R., Kriauciunas, K. M., Ueki, K., Kahn, C. R. (2001). *Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling*. Molecular and Cellular Biology, 21(1), 26–38.

V

Vallerie, S. N., Furuhashi, M., Fucho, R., Hotamisligil, G. S. (2008). *A predominant role for parenchymal c-Jun amino terminal kinase (JNK) in the regulation of systemic insulin sensitivity*. PLoS ONE, 3(9).

Valverde, A.M., Burks, D.J., Fabregat, I., Fisher, T.L., Carretero, J., White, M.F., Benito, M. (2003). *Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes*. Diabetes 52, 2239-2248.

Vilà, L., Roglans, N., Alegret, M., Sanchez, R.M., Vazquez-Carrera, M., Laguna, J.C. (2008). *Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism*. Hepatology 48, 1506-1516.

Vilà, L., Roglans, N., Perna, V., Sánchez, R. M., Vázquez-Carrera, M., Alegret, M., Laguna, J. C. (2011). *Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose*. Journal of Nutritional Biochemistry, 22(8), 741–751.

W

Walter, P., Ron, D. (2011). *The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation*. Science, 334(November), 1081–1086.

Waterworth, D. M., Talmud, P. J., Bujac, S. R., Fisher, R. M., Miller, G. J., Humphries, S. E. (2000). *Contribution of apolipoprotein C-III gene variants to determination of triglyceride levels and interaction with smoking in middle-aged men*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 20(12), 2663–2669.

Wendel, A. A., Lewin T. M., Coleman R. A. (2009). *Glycerol-3-phosphate acyltransferases: Rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis*. Biochim Biophys Acta. June; 1791(6): 501–506

Welsh, J. A., Sharma, A., Abramson, J. L., Vaccarino, V., Gillespie, C., Vos, M.B. (2010). *Caloric sweetener consumption and dyslipidemia among US adults*. JAMA. Apr 21;303(15):1490-7.

Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley, R. E., Institutes, N. (2014). *Hypoadiponectinemia in Obesity and Type 2 Diabetes : Close Association with Insulin Resistance and Hyperinsulinemia*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86(5), 1930–1935.

White, J. S., Hobbs, L. J., Fernández, S. (2015). *Fructose content and composition of commercial HFCS-sweetened carbonated beverages*. International Journal of Obesity. 39, 176–182.

Witczak, C., Hirshman, M. F., Jessen, N., Fujii, N., Seifert, M., Brandauer, J., Goodyear, L. J. (2006). *JNK1 Deficiency Does Not Enhance Muscle Glucose Metabolism in Lean Mice*. Biochem Biophys Res Commun, December 350(4), 1063–1068.

Wong, R. H. F., Sul, H. S. (2010). *Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: A transcriptional perspective*. Current Opinion in Pharmacology, 10(6), 684–691.

Wu, Z., Jiao, P., Huang, X., Feng, B., Feng, Y., Yang, S., Xu, H. (2010). *MAPK phosphatase-3 promotes hepatic gluconeogenesis through dephosphorylation of forkhead box O1 in mice*. Journal of Clinical Investigation, 120(11), 3901–3911.

X

Xu, J., Liu, X., Koyama, Y., Wang, P., Lan, T., Kim, I. G., Kisseleva, T. (2014). *The types of hepatic myofibroblasts contributing to liver fibrosis of different etiologies*. Frontiers in Pharmacology, 5 JUL(July), 1–12.

Y

Yahagi, N., Shimano, H., Hasty, A. H., Matsuzaka, T., Ide, T., Yoshikawa, T., Yamada, N. (2002). *Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lepob/Lepob mice*. Journal of Biological Chemistry, 277(22), 19353–19357.

Yang, R., Wilcox, D. M., Haasch, D. L., Jung, P. M., Nguyen, P. T., Voorbach, M. J., Surowy, T. K. (2007). *Liver-specific knockdown of JNK1 up-regulates proliferator-activated receptor γ coactivator 1 β and increases plasma triglyceride despite reduced glucose and insulin levels in diet-induced obese mice*. Journal of Biological Chemistry, 282(31), 22765–22774.

Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E.S., Hotamisligil G.S. (2010). *Defective Hepatic Autophagy in Obesity Promotes ER Stress and Causes Insulin Resistance*. Cell Metabolism 11, 467–478.

Ye, J. (2013). *Mechanisms of insulin resistance in obesity Jianping*. Front Med, 7(1), 14–24.

Yorimitsu, T., Klionsky, D. J. (2005). *Autophagy: molecular machinery for self-eating*. Cell Death and Differentiation, 12 Suppl 2, 1542–1552.

Yue, Y., Wang, Y., Li, D., Song, Z., Jiao, H., Lin, H. (2015). *A central role for the mammalian target of rapamycin in LPS-induced anorexia in mice*. Journal of Endocrinology, 224(1), 37–47.

Z

Zhang, Y., Gao, X., Saucedo, L. J., Ru, B., Edgar, B. A., Pan, D. (2003). *Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins*. Nature Cell Biology, 5(6), 578–581.

Zang, M., Zuccollo, A., Hou, X., Nagata, D., Walsh, K., Herscovitz, H., Brecher, P., Ruderman, N.B., Cohen, R.A. (2004). *AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells*. J. Biol. Chem. 279, 47898-47905.

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E. (2001). *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action*. J. Clin. Invest 108, 1167-1174.

Zivkovic, A. M., German, J. B., Sanyal, A. J. (2007). *Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease*. The American Journal of Clinical Nutrition, 86(2), 285–300.

IX. ANEXO: PUBLICACIONES

Liquid fructose down-regulates liver insulin receptor substrate 2 and gluconeogenic enzymes by modifying nutrient sensing factors in rats[☆]

Alba Rebollo^{a,1}, Núria Roglans^{b,c,1}, Miguel Baena^{b,c}, Anna Padrosa^{b,c}, Rosa M. Sánchez^{b,c}, Manuel Merlos^{b,c}, Marta Alegret^{b,c}, Juan C. Laguna^{b,c,*}

^aDepartment of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy, University of Barcelona, Avenida Diagonal 643, Barcelona 08028, Spain

^bInstitute of Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona 08028, Spain

^cCentro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Barcelona 08028, Spain

Received 20 June 2013; received in revised form 24 October 2013; accepted 24 October 2013

Abstract

High consumption of fructose-sweetened beverages has been linked to a high prevalence of chronic metabolic diseases. We have previously shown that a short course of fructose supplementation as a liquid solution induces glucose intolerance in female rats. In the present work, we characterized the fructose-driven changes in the liver and the molecular pathways involved. To this end, female rats were supplemented or not with liquid fructose (10%, w/v) for 7 or 14 days. Glucose and pyruvate tolerance tests were performed, and the expression of genes related to insulin signaling, gluconeogenesis and nutrient sensing pathways was evaluated.

Fructose-supplemented rats showed increased plasma glucose excursions in glucose and pyruvate tolerance tests and reduced hepatic expression of several genes related to insulin signaling, including insulin receptor substrate 2 (IRS-2). However, the expression of key gluconeogenic enzymes, glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase, was reduced. These effects were caused by an inactivation of hepatic forkhead box O1 (FoxO1) due to an increase in its acetylation state driven by a reduced expression and activity of sirtuin 1 (SIRT1). Further contributing to FoxO1 inactivation, fructose consumption elevated liver expression of the spliced form of X-box-binding-protein-1 as a consequence of an increase in the activity of the mammalian target of rapamycin 1 and protein 38-mitogen activated protein kinase (p38-MAPK). Liquid fructose affects both insulin signaling (IRS-2 and FoxO1) and nutrient sensing pathways (p38-MAPK, mTOR and SIRT1), thus disrupting hepatic insulin signaling without increasing the expression of key gluconeogenic enzymes.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Insulin resistance; FoxO1; XBP-1; SIRT1; p38-MAPK; mTOR

1. Introduction

During the last decade, there has been an increasing number of published epidemiological and interventional studies on human populations linking the high consumption of sugar-sweetened beverages, enriched in simple sugars such as fructose and glucose, to the high prevalence of chronic metabolic and related cardiovascu-

lar diseases [1–4]. These diseases include dyslipidemia [5,6], gout [7], hypertension [8,9], obesity [10,11], insulin resistance [12] and type 2 diabetes mellitus [10,13–15]. High energy intake, lack of adequate energy compensation through a proportional decrease in the amount of energy ingested as solid foods and the special metabolism of fructose have been reported to contribute to this possible causal association [2,3].

Among the experimental animal models used, fructose-fed rats can reproduce metabolic alterations induced by fructose consumption in humans. Rats, like humans, cannot transform ingested fructose into glucose [16]. Moreover, in both rats and humans, continuous fructose ingestion induces the expression of fructokinase, an enzyme that drives fructose into liver metabolic pathways [17–19]. The changes associated with the human metabolic syndrome can be reproduced in rats by providing them fructose as a 10% (w/v) solution [20–22]. This mimics the level of dietary consumption of sweetened beverages (as a percentage of the daily caloric intake about 30%) that leads to clear metabolic disturbances in humans [23,24]. Using this model, we recently discovered a gender difference in the response to fructose consumption, with clear signs of glucose intolerance after a short 14-day course of fructose supplementation in female, but not male, rats

[☆] This study was supported by grants from the Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2010-15664) and the European Union FEDER funds. Alba Rebollo was supported by a predoctoral grant from Fondo Investigaciones Sanitarias/Instituto de Salud Carlos III. Miguel Baena was supported by a FPI-MICINN grant from the Spanish Ministry of Science and Innovation. We are a Consolidated Research Group of the Autonomous Government of Catalonia (SGR09-00413).

* Corresponding author. Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy, University of Barcelona, Avenida Diagonal 643, Barcelona 08028, Spain. Tel.: +34-93-4024530 ext 13; fax: +34-93-4035982.

E-mail address: jclagunae@ub.edu (J.C. Laguna).

¹A.R. and N.R. contributed equally to this work.

[17]. We also found that fructose-fed female rats displayed a significantly reduced expression of liver insulin receptor substrate 2 (IRS-2) [17], one of the key insulin-signaling proteins in the liver [25].

We therefore pursued the search for the molecular mechanism underlying the glucose intolerance observed after fructose supplementation in female rats. In the present work, we show that fructose induces a set of complex molecular alterations in the liver expression of nutrient sensing factors, which reduces the expression of both liver IRS-2 and gluconeogenic enzymes in fructose-supplemented female rats.

2. Methods

2.1. Animals and experimental design

Female Sprague–Dawley rats purchased from Charles River (Barcelona, Spain) were maintained with water and food *ad libitum* at constant humidity and temperature with a light/dark cycle of 12 h. The animals were randomly separated into a control and a fructose-supplemented group (8 and 12 rats per group, respectively). Fructose was supplied as a 10% (w/v) solution in drinking water for 7 and 14 days. Control animals received no supplementary sugar. At the end of this period, animals were killed by decapitation under isoflurane anesthesia at 10 a.m. Food and fructose solution were removed at 8 a.m. To reduce the variability in plasma estrogen concentrations, female rats were killed during the diestrus period.

Subgroups of female rats were randomly separated into control and fructose-supplemented groups, as described above, for glucose and pyruvate tolerance tests.

All procedures were conducted in accordance with the guidelines established by the University of Barcelona's Bioethics Committee, as stated in the Autonomous Government of Catalonia's Law 5/1995 (21st of July).

2.2. Sample preparations

Blood and liver tissue samples were collected and stored as described previously [21]. Total and nuclear extracts were isolated using the Helenius method [26]. Protein concentrations were determined by the Bradford method [27].

2.3. Lipids, glucose, insulin, adiponectin and leptin analysis

Plasma triglyceride, glucose, insulin, leptin and adiponectin concentrations were measured as described previously [21].

2.4. Glucose tolerance test

After a 2-h fast, the rats were anesthetized, and following the collection of an unchallenged sample (*time 0*), a glucose solution of 2 g/kg body weight was administered into the peritoneal cavity. During the test, blood was collected from the saphenous vein at 15, 30, 60, 90 and 120 min after glucose administration. Glucose measurements were performed using a hand-held glucometer. Plasma insulin levels were measured at baseline, 15, 60 and 120 min post-glucose administration using a rat insulin enzyme-linked immunosorbent assay kit (Millipore, Billerica, MA).

2.5. Pyruvate tolerance test

Rats were injected with sodium pyruvate (2 g/kg ip). Plasma glucose levels were determined at 0, 15, 30, 60, 90, 120 and 150 min after injection with a hand-held glucometer as described above.

2.6. Cell culture

Rat hepatoma FaO cells were obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). The cells were cultured in low glucose DMEM (Gibco, Life Technologies, Madrid, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS Gold; PAA, Piscataway, NJ) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin; Gibco, Life Technologies, Madrid, Spain). When cells reached 80% confluence, the proportion of serum was reduced to 1% and the cells were incubated in the absence or presence of fructose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at a concentration of 25 mM for 24 h.

2.7. RNA preparation and analysis

Total RNA was isolated using the TrizolR reagent (Invitrogen, Life Technologies, Madrid, Spain). The levels of specific mRNAs were assessed by real-time reverse transcription (RT)–polymerase chain reaction (PCR) using Sybergreen PCR Master Mix, specific primers and the Applied Biosystems One-Step Plus sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA). For G6Pc, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and X-box-binding-protein-1 (XBP-1), we used conventional RT–PCR as described previously [34]. Adenosyl phosphoribosyl transferase or 18S was used as an

internal control. The primer sequences, resulting PCR products and number of cycles are listed in Supporting Table 1.

2.8. Western-blot analysis

Ten to thirty micrograms of different protein fractions from the rat livers were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Proteins were then transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride transfer membranes (Millipore, Billerica, MA), blocked for 1 h at room temperature with 5% non-fat milk solution in 0.1% Tween-20 Tris-buffered saline (TBS) and incubated as described previously [21]. Detection was performed with the ECL chemiluminescence kit for HRP (Amersham GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona, Spain). To confirm the uniformity of protein loading, the blots were incubated with the β-actin or β-tubulin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) as a control. The size of the detected proteins was estimated using protein molecular mass standards (Invitrogen, Life Technologies, Madrid, Spain). Antibodies were obtained from Santa Cruz Technologies (Santa Cruz, CA), except those for phospho- and total protein kinase B or Akt, phospho- and total protein 38-mitogen activated protein kinase (p38-MAPK) and PP2Ac, which were obtained from Cell Signaling (Danvers, MA), and phospho- and total mTOR were purchased from Millipore (Billerica, MA).

2.9. Co-immunoprecipitation

Two hundred micrograms of protein extracts was precleared in preclearing matrix F (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 2 h at 4°C, and the resulting supernatant was immunoprecipitated for 4 h at 4°C with 4 µg of anti-acetyl-lysine (Cell Signaling, Danvers, MA) in a final volume of 0.5 ml made up with buffer containing 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) and 2% bovine serum albumin. Immunocomplexes were captured by incubating the samples with protein A-agarose suspension (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) overnight at 4°C on a rocker platform. Agarose beads were collected by centrifugation and washed three times with PBS-containing protease inhibitors. After microcentrifugation, the pellet was re-suspended with 60 µl of SDS-PAGE sample buffer and boiled for 5 min at 100°C. The supernatant was subjected to electrophoresis on 10% SDS-PAGE and immunoblotted with an antibody against forkhead box O1 (FoxO1) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

2.10. PCR arrays

Total RNA was isolated from control and fructose-fed rats as described above and then purified using RNeasy kit columns (Qiagen Iberia, Madrid, Spain). Single-stranded cDNA and PCR arrays were performed using the *Rat Insulin Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array* (PARN-030E) from SABiosciences (Qiagen Iberia, Madrid, Spain), following the manufacturer's guidelines. Array data processing and analysis were performed using a Web portal from SABiosciences.

2.11. Statistics

The results are expressed as the mean of *n* values ± standard deviation. Plasma samples were assayed in duplicate. Significant differences were established by the unpaired *t* test, one-way analysis of variance (ANOVA) test (with a *posteriori* analysis) for cell culture experiments or the two-way ANOVA test (with a *posteriori* analysis) for plasma analytes, using the computer program GraphPad InStat (GraphPad Software V2.03). When the number of animals was too small or the variance was not homogeneous, a non-parametric Mann–Whitney test was performed for comparing two groups. **P*<.05, ***P*<.01, #*P*<.001 14-day control vs. 7-day control, in tables and figures.

Table 1
Fructose effects on liquid and food ingestions, plasma analytes, insulin sensitivity index and glucose tolerance test

	7 days		14 days	
	Control	Fructose	Control	Fructose
AUC ingested liquid (ml/days/2 rats)	360±8	845±198*	706±91	1995±430*
AUC consumed diet (g/days/2 rats)	227±2	177±13**	503±12	392±44*
Body weight (g)	249±7	257±19	264±26	278±21
Adiponectin (µg/ml)	2.7±0.7	3.9±1.5	2.3±0.7	4.0±0.7*
Leptin (ng/ml)	2.0±1.0	3.2±2.3	2.8±2.7	4.7±2.2
Insulin (µg/ml)	0.46±0.07	0.65±0.26	0.51±0.12	0.94±0.43*
Glucose (mg/dl)	151±7	158±11	190±12#	210±16*
ISI	1.21±0.07	1.09±0.14	1.06±0.14#	0.76±0.21*
AUC glucose concentration for glucose tolerance test (% vs. control)	100±15	100±12	100±23	132±25*

3. Results

A 14-day course of fructose ingestion in liquid form is sufficient to induce glucose intolerance in female Sprague–Dawley rats. Fructose administration as a 10% (w/v) liquid solution to female Sprague–Dawley rats increased energy intake by 26% and 29% after 7 and 14 days of supplementation, respectively, compared to the

amount of energy consumed by control animals, despite fructose-supplemented rats reducing the ingestion of their solid diet by 22%. In agreement with our previous results [17], fructose consumption by female rats did not modify body weight, but it increased plasma glucose and insulin concentrations only after the 14-day course of fructose supplementation, thus significantly reducing the insulin sensitivity index (ISI) in these animals (Table 1). Furthermore, only

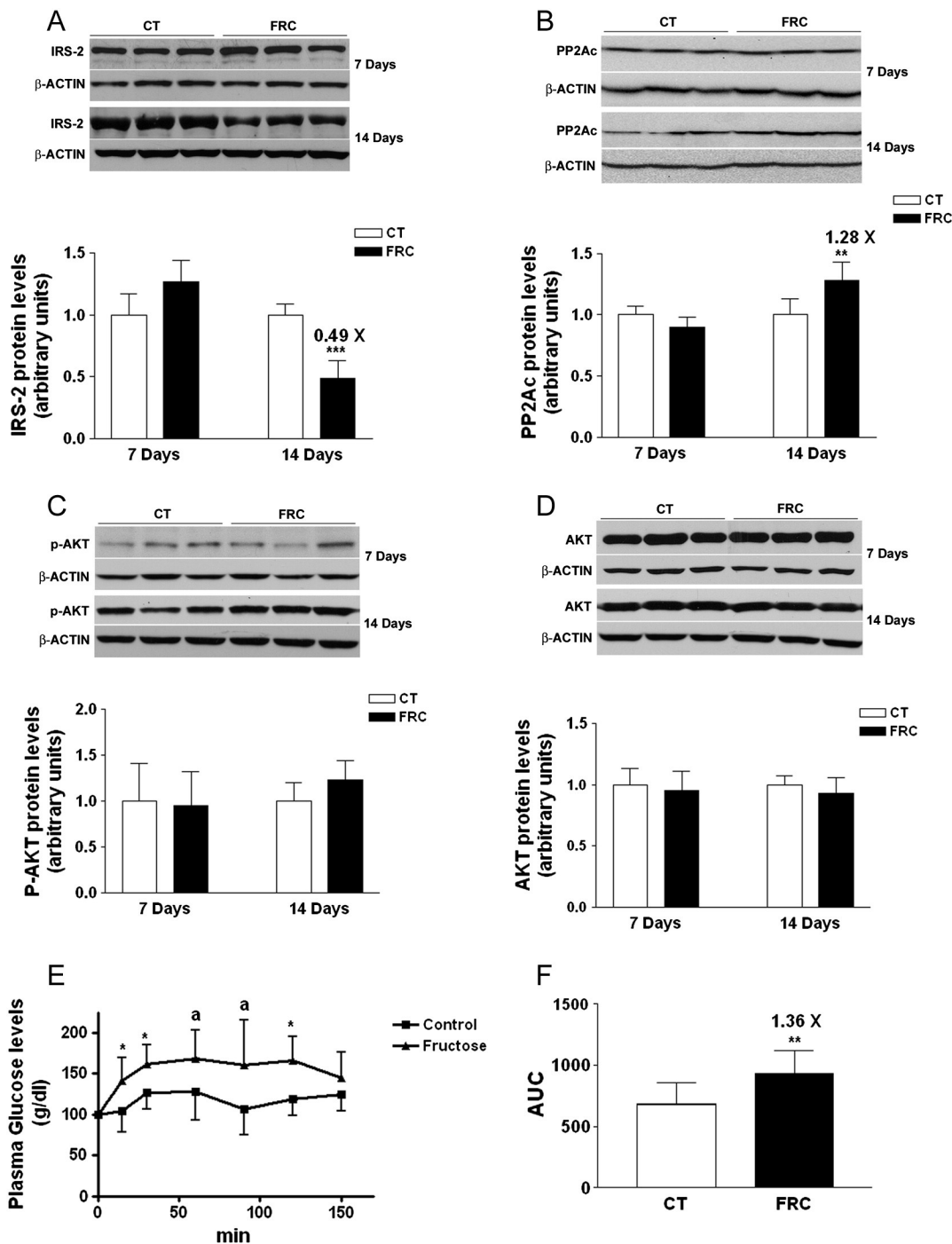


Fig. 1. Expression of proteins involved in insulin signaling in the livers of fructose-supplemented female rats. Western-blot of IRS-2 (A), PP2Ac (B) and phospho- (C) and total Akt (D) proteins in the liver samples from control and fructose-supplemented female rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown. Bar plots show the levels of each protein, expressed as the mean (a.u., arbitrary units)±S.D. of the values obtained from 6 animals, in the hepatic samples from control (white bar) and fructose-supplemented (black bar) rats. The amount of protein loaded was confirmed by the Bradford method, and the uniformity of protein loading in each lane was assessed using β-actin as the loading control. (E) Plasma glucose concentrations after the injection of pyruvate (2 g/kg ip). (F) The mean value of the AUC, expressed as grams of glucose per 150 min per animal, for control and fructose-supplemented rats.

Table 2
Change in gene expression after 7 or 14 days of fructose feeding for a selection of genes analyzed using real-time PCR arrays (Rat Insulin Signaling Pathway RT² Profiler)

Description	Symbol	7 days		14 days	
		Fold change	P value	Fold change	P value
CAP adenylate cyclase-associated protein 1	Cap-1	0.883	.340	0.822	.029
Docking protein 1	Dok1	0.933	.479	0.537	.052
Docking protein 3	Dok3	1.165	.602	0.485	.044
GRB2-associated binding protein 1	Gab1	0.918	.624	0.737	.043
Insulin-like growth factor 1 receptor	Igf1r	1.009	.896	0.551	.009
Insulin receptor substrate 1	IRS-1	1.662	.024	0.640	.063
Insulin receptor substrate 2	IRS-2	1.197	.451	0.545	.013
Mitogen activated protein kinase 1	MAPK1	1.012	.961	0.770	.032
Protein kinase C, zeta	PrKcz	1.721	.004	0.349	.059
Solute carrier family 27 (fatty acid transporter) member 4	Slc27a4	0.783	.189	0.597	.025
Son of sevenless homolog 1	Sos1	1.009	.377	0.781	.033
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	PEPCK	1.197	.403	1.313	.018
Glucose-6-phosphatase	G6Pc	1.598	.317	0.412	.19

the rats supplemented for 14 days displayed changes in their glucose tolerance test, with a significant 30% increase in the area under the curve (AUC) value for plasma glucose concentration (Table 1). Again, confirming our previous results [17], livers from 14-day fructose-supplemented rats showed a marked reduction in the expression of IRS-2 protein (Fig. 1A), the main transducer of insulin signaling in liver tissue [28], and a significant increase (1.28-fold) in the amount of the active form of protein phosphatase 2A

(PP2Ac), a marker of increased fructose metabolism (Fig. 1B). Moreover, in FaO rat hepatoma cells, incubation with 25 mM fructose for 24 h blunted the increase in the IRS-2 protein levels induced by a short course (10 min) of insulin treatment (Supporting Fig. 1A). Thus, to confirm fructose-mediated impairment of insulin signaling, we determined the expression of V-akt murine thymoma viral oncogene homolog-2 (Akt-2), one of the main transducers of insulin signaling downstream of IRS-2, *in vivo* and in

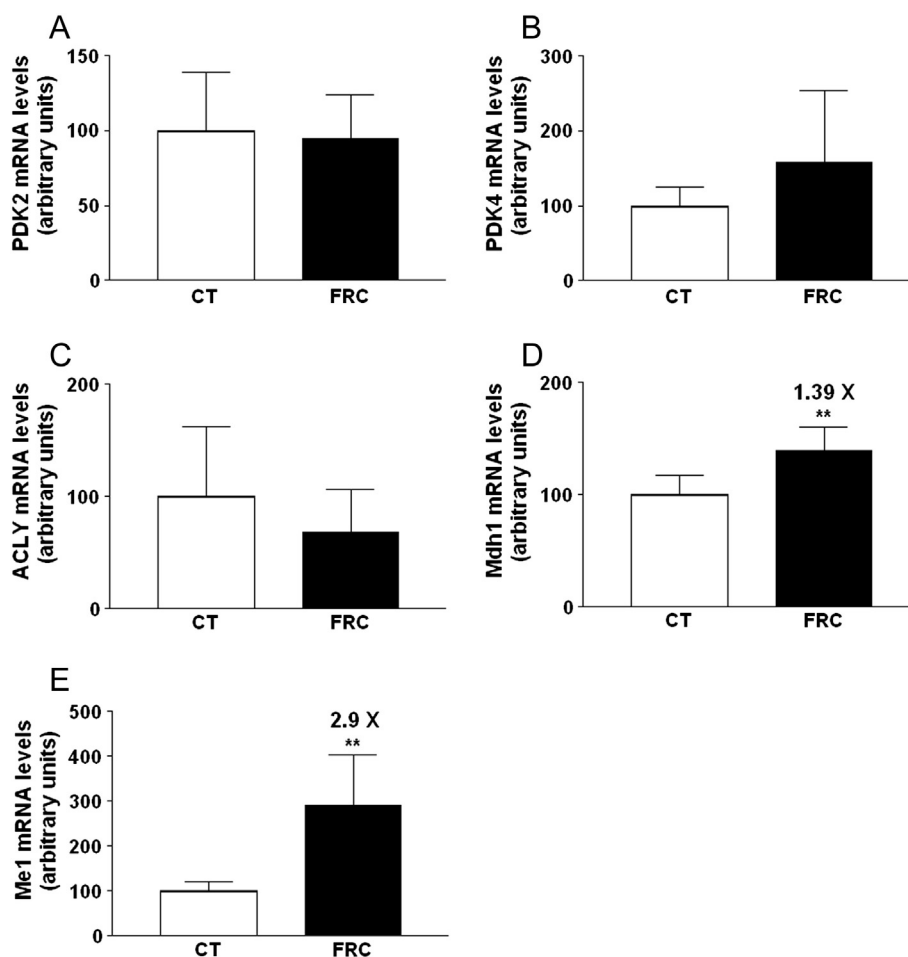


Fig. 2. Expression of enzymes related to glucose metabolism in the livers of 14-day fructose-supplemented female rats. The mRNA levels of liver pyruvate dehydrogenase kinase 2 (PDK2) (A), pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) (B), ATP citrate lyase (ACLY) (C), malate dehydrogenase (MD) (D) and malic enzyme (ME) (E) in the hepatic samples from control (white bar) and fructose-supplemented female (black bar) rats are given. Each bar represents the mean \pm S.D. of the values obtained from 6 animals. Specific mRNA levels were determined by real-time PCR as described in Methods.

FaO cells. Despite the mild hyperinsulinemia present in Sprague–Dawley rats after 14 days of fructose supplementation (see Table 1), neither the active, phosphorylated form of Akt nor total Akt were significantly affected in the livers of these rats (Fig. 1C and D). Moreover, although insulin could significantly increase the amount of phosphorylated Akt in FaO cells (1.66-fold), this increase was partially blocked by incubation with 25 mM fructose for 24 h (Supporting Fig. 1B). At the same time, fructose markedly elevated the amount of total Akt in insulin-treated FaO cells, further decreasing the ratio of phosphorylated Akt to total Akt with respect to insulin-treated cells (1.94 vs. 0.88; 0.45-fold). Due to the decreased liver insulin signaling in fructose-supplemented rats, the bolus administration of a direct gluconeogenic precursor such as pyruvate significantly increased (1.33-fold) the liver output of glucose in rats after 14 days of fructose (Fig. 1E and F).

Fructose disrupts insulin signaling in the liver. To gain an overview of the effect of fructose on the expression of genes related to insulin signaling, we applied the Rat Insulin Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array (see Methods) to liver samples obtained from female rats supplemented with fructose for 7 and 14 days. As shown in Table 2, two clear patterns of changes in gene expression were detected: (1) an increase in the expression of genes related to lipid synthesis, such as *acc* (acetyl-CoA carboxylase), *fas* (fatty acid synthase) and *l-pk* (liver-pyruvate kinase) at the two timepoints studied; (2) a decrease in the expression of genes related to insulin and insulin growth factor signaling, such as *irs-2*, *cap1* (adenylate cyclase-associated protein 1) and *dok1* and 3 (docking protein 1 and 3), confirming a deficit in the expression of key genes involved in insulin signal transduction. Surprisingly, the expression of two key gluconeogenic genes, *g6pc* (glucose-6-phosphatase) and *pck* (PEPCK), was hardly affected in the livers of 14-day fructose-supplemented rats. Theoretically, disrupted insulin-signaling should trigger an increase in liver gluconeogenesis, as shown by the results obtained in the pyruvate-challenge test (see Fig. 1E and F), mainly through the increased expression and activity of G6Pc and PEPCK [29]. In fact, when we reassessed the mRNA levels of G6Pc and PEPCK using gene-specific conditions, we detected significant reductions in the expression of G6Pc and PEPCK in the livers of 14-day fructose-supplemented rats (0.74- and 0.36-fold for G6Pc and PEPCK, respectively) (Supporting Fig. 2A and B). The liver protein levels of both enzymes were also decreased (0.76- and 0.58-fold for G6Pc and PEPCK, respectively), although not significantly (Supporting Fig. 2C and D).

To explain the increased hepatic glucose output despite a decreased expression of key gluconeogenic enzymes, we examined the expression of other enzymes controlling the substrate flux from cytosolic pyruvate to glucose formation (Fig. 2). We found an increased expression of malate dehydrogenase (1.39-fold) and malic enzyme (2.90-fold) in the livers of 14-day fructose-supplemented rats (Fig. 2E and F). In the case of very high concentrations of pyruvate, such as in the pyruvate tolerance test, the combined increase in the activities of malate dehydrogenase and malic enzyme could generate an amount of oxalacetate (substrate of PEPCK) sufficient to significantly increase the liver output of glucose in 14-day fructose-supplemented rats despite the reduced expression of both G6Pc and PEPCK. Thus, we decided to explore the possible molecular mechanisms involved in the fructose-mediated reduction of liver gluconeogenic enzymes expression.

Fructose selectively modifies key liver transcription factors involved in the expression of the *g6pc* and *pck* genes. Peroxisome proliferator coactivator-1 alpha (PGC-1 α) and FoxO1 transcription factors control the liver expression of the *g6pc* and *pck* genes [30,31]. Very recently, the spliced form of XBP-1 was directly implicated in the regulation of liver glucose homeostasis through an interaction with FoxO1 [32]. Hence, we were interested in assessing the expression of these transcription factors in liver samples from 7- and 14-day

fructose-supplemented rats. Although the expression of PGC-1 α was not modified (data not shown), fructose supplementation significantly increased XBP-1s expression, especially after 14 days (Fig. 3). The effect of fructose on FoxO1 expression was very complex. Activation of the insulin signaling cascade, through the PIK3-IRS-2-Akt pathway, phosphorylates FoxO1, which then exits the nucleus and translocates to the cytosol, leading to the suppression of gluconeogenic gene expression [31]. In liver samples from 14-day fructose-supplemented rats, the amount of the inactive, phosphorylated form of FoxO1 was increased (1.78-fold), while the total amount of FoxO1 protein was decreased (0.87-fold), further increasing the ratio of inactive phospho-FoxO1 to total FoxO1 (2.10-fold) (Fig. 4A–C). Despite this, the amount of FoxO1 protein present in liver nuclear extracts rose by 2.08-fold in the livers of 14-day fructose-supplemented rats (Fig. 4D). Thus, although the liver insulin-IRS-2-Akt signaling pathway was suppressed by fructose (see Fig. 1), FoxO1 was phosphorylated (and inactivated) but remained in the nuclear compartment.

Fructose significantly changes the activity and expression of key nutrient sensing molecules in the liver. To decipher the complex changes induced by fructose in insulin signaling, we focused our attention on three key molecular transducers involved in nutrient sensing in liver cells: mTOR [33], the stress kinase p38-MAPK [34] and sirtuin 1 (SIRT1) [33]. As shown in Fig. 5, fructose enhanced the phosphorylated, active form of mTOR (Fig. 5A) (1.7-fold) and p38-MAPK (Fig. 5B) (2.7-fold) only in the livers of 14-day fructose-supplemented rats. On the contrary, SIRT1 protein levels were

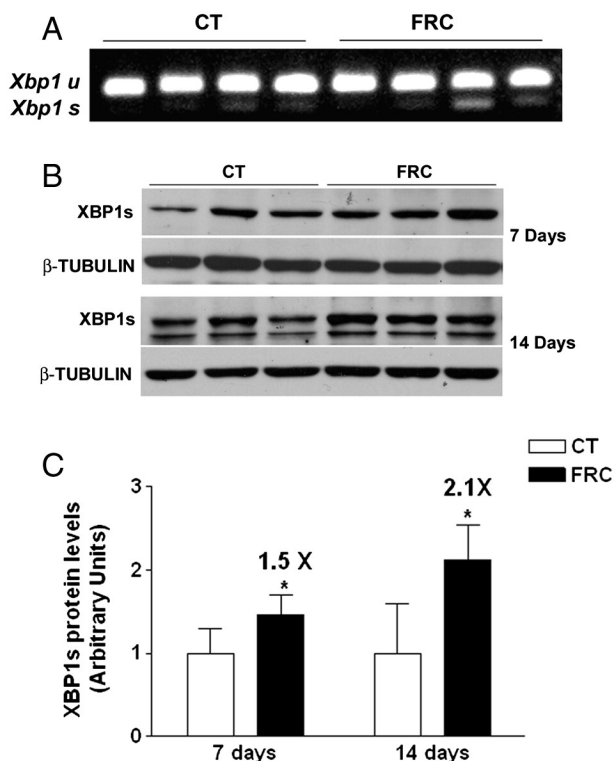


Fig. 3. XBP-1 expression in the livers of control and fructose-supplemented rats. (A) Autoradiograph of an agarose gel showing bands corresponding to unspliced (u) and spliced (s) XBP-1 mRNA in liver samples corresponding to four control and four fructose-supplemented rats for each timepoint. Western-blot of the spliced form of XBP-1 (XBP-1s) (B) in the livers of control and fructose-supplemented female rats. A bar plot (C) shows the levels of the proteins, expressed as the mean (a.u., arbitrary units) \pm S.D. of the values obtained from 6 animals, in the hepatic samples from control (white bar) and fructose-supplemented (black bar) rats. The amount of protein loaded was confirmed by the Bradford method, and the uniformity of protein loading in each lane was assessed using β -tubulin as loading control.

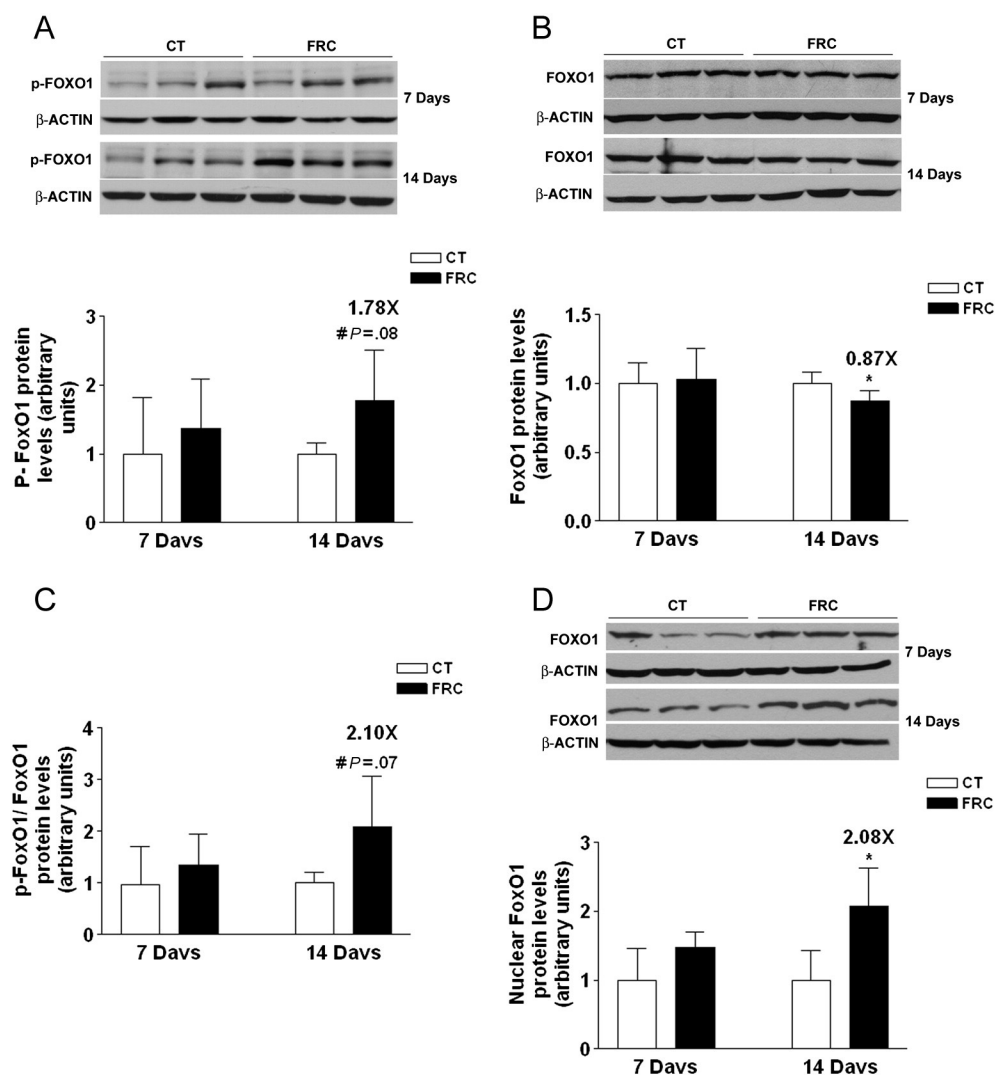


Fig. 4. FoxO1 protein expression in the livers of control and fructose-supplemented rats. Western-blot of phospho-FoxO1 (A) and total FoxO1 levels in whole liver homogenates (B) and nuclear extracts (D) from control and fructose-supplemented female rats. A bar plot shows the levels of the proteins, expressed as the mean (a.u., arbitrary units) \pm S.D. of the values obtained from 6 animals, in the hepatic samples from control (white bar) and fructose-supplemented (black bar) rats. The amount of protein loaded was confirmed by the Bradford method, and the uniformity of protein loading in each lane was assessed using of β -actin as loading control. (C) A bar plot showing the ratio of phospho- to total FoxO1, expressed as the mean (a.u., arbitrary units) \pm S.D. of the values obtained from 6 animals, in whole liver homogenates from control (white bar) and fructose-supplemented (black bar) rats.

markedly reduced (Fig. 6A) (0.51-fold), again only in the livers of 14-day fructose-supplemented rats. To confirm that both SIRT1 expression and activity were decreased by fructose supplementation, we assessed the presence of one of its substrates, acetylated-FoxO1 [35]. Indeed, the amount of acetylated-FoxO1 was markedly increased in liver samples from 14-day fructose-supplemented rats (Fig. 6B), consistent with the decreased SIRT1 activity in these samples. When we assessed the effect of fructose on the expression of mTOR, p38-MAPK and SIRT1 in FaO cells, only the phosphorylated, active form of p38-MAPK was increased (1.23-fold; Supporting Fig. 3B).

4. Discussion

We previously demonstrated that a short course (14 days) of fructose supplementation as a liquid solution was sufficient to induce glucose intolerance only in female, but not male, rats [17]. In the present work, we detected a clear rise in the liver glucose output after a bolus administration of a direct gluconeogenic precursor, such a pyruvate, to 14-day fructose-supplemented rats. Higher than usual plasma concentrations of glucose in control animals were due to the

fact that rats were fasted only 2 h before sacrifice (see Animals and experimental design). However, we were surprised to note a significant reduction in the expression of two key gluconeogenic enzymes, PEPCK and G6Pc, despite a clear impairment in insulin signaling in the livers of these rats. Thus, we searched for the molecular cues that could explain this situation. Our main findings indicate that, through a complex chain of molecular changes affecting both insulin signaling (IRS-2 and FoxO1) and nutrient sensing pathways (p38-MAPK, mTOR and SIRT1), fructose metabolism in the liver disrupts insulin signaling without affecting, or even decreasing, the expression of key gluconeogenic enzymes. These results suggest that the path from fructose consumption to the production of insulin resistance is not as straightforward as previously thought. Moreover, these changes seem to be specifically related to fructose consumption and not to general changes in the amount of solid food ingested or total energy intake. Although solid food consumption was reduced by 22% by fructose ingestion, the amount of macronutrients and micronutrients ingested daily by the fructose-supplemented animals was equally or above the estimated nutrient requirements for maintenance and growth of rats (see

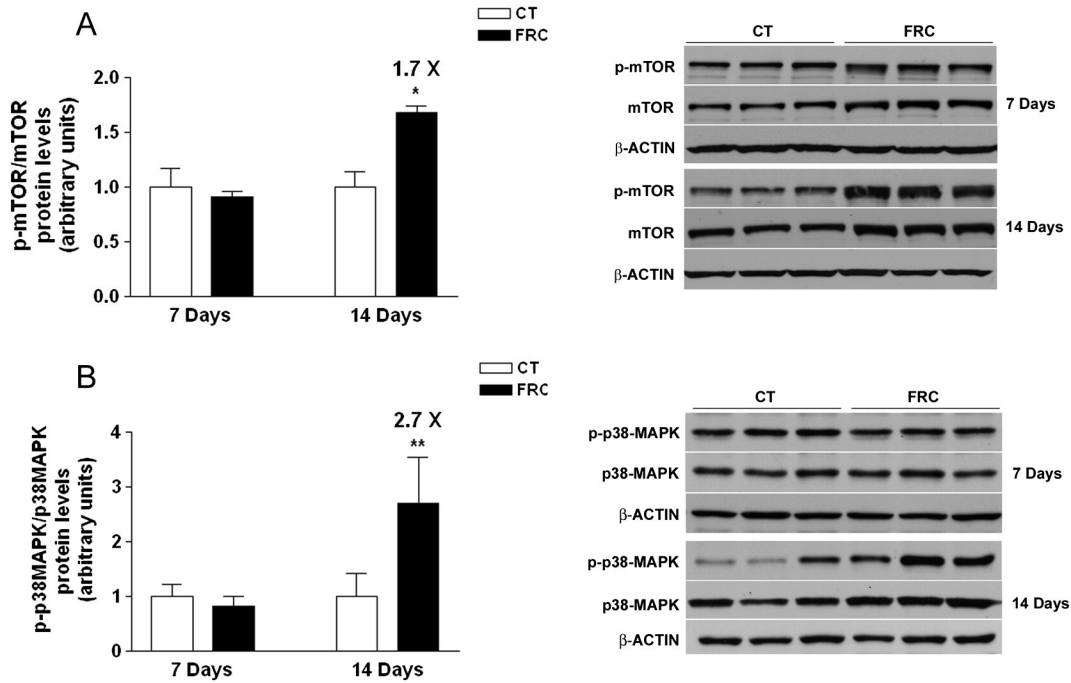


Fig. 5. Activity of nutrient sensing kinases is increased in the livers of 14-day fructose-supplemented rats. Western-blot of phospho- and total mTOR (A) and phospho- and total p38-MAPK (B) proteins in the livers of control and fructose-supplemented female rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown. As a measure of the degree of kinase activation, bar plots show the ratio of the phospho- to the total contents of each kinase, expressed as the mean (a.u., arbitrary units) ± S.D. of the values obtained from 6 animals, in the hepatic samples from control (white bar) and fructose-supplemented (black bar) rats. The amount of protein loaded was confirmed by the Bradford method, and the uniformity of protein loading in each lane was assessed using β-actin as loading control.

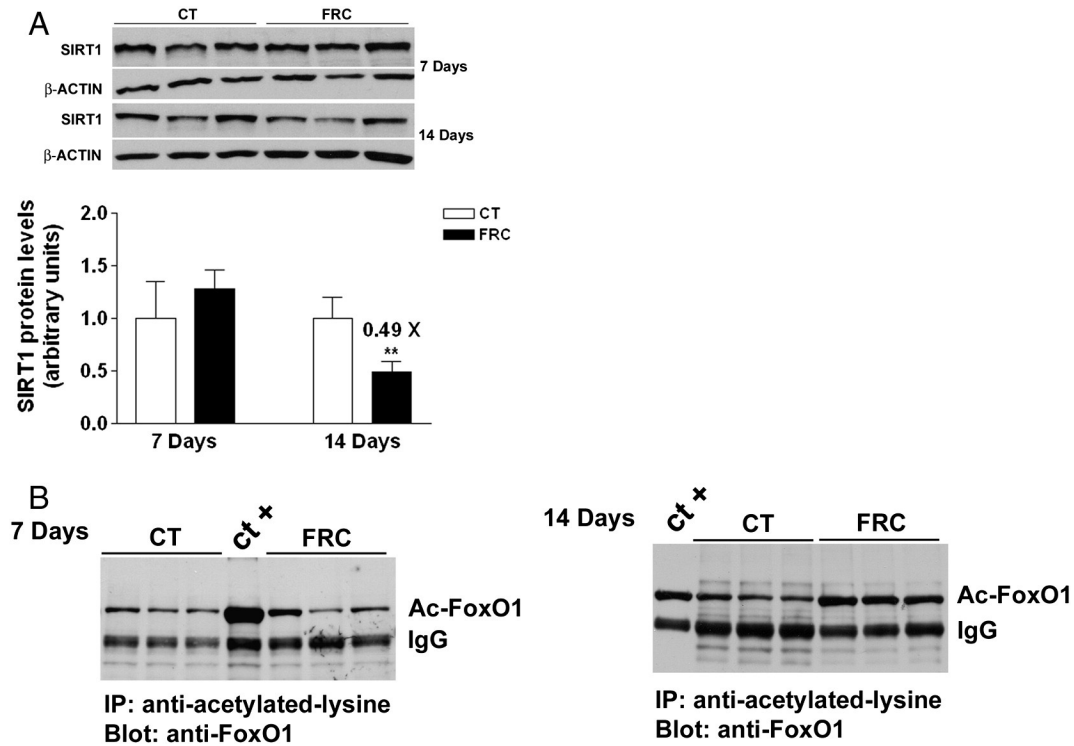


Fig. 6. SIRT1 expression and activity is decreased in the livers of 14-day fructose-supplemented rats. Western-blot of SIRT1 protein (A) in the livers of control and fructose-supplemented female rats. Representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown. Bar plots show the protein level, expressed as the mean (a.u., arbitrary units) ± S.D. of the values obtained from 6 animals, in the hepatic samples from control (white bar) and fructose-supplemented (black bar) rats. The amount of protein loaded was confirmed by the Bradford method, and the uniformity of protein loading in each lane was assessed using β-actin as loading control. As an indirect measure of SIRT1 activity, the amount of the acetylated form of FoxO1 (B) in the liver samples from control and fructose-supplemented animals was determined by co-immunoprecipitation, as described in Methods.

Supplemental Table 2). Furthermore, we have shown previously that rats supplemented with a 10% (w/v) liquid solution of glucose despite ingesting the same amount of energy as rats supplemented with a 10% liquid solution of fructose did not show similar changes in main metabolic parameters, such as plasma and liver triglyceride, PPAR α expression and β -oxidation activity [21].

p38-MAPK is a stress-related kinase [34] whose activity can be increased by the metabolic burden imposed by fructose metabolism in hepatocytes through two mechanisms: increased activity of protein phosphatase 2A [36] and the presence of bacterial toxins in blood, as a result of fructose-mediated changes in the intestinal barrier permeability [37,38]. Indeed, we could detect a clear increase in the phosphorylated, activated form of p38-MAPK only in the liver samples of 14-day fructose-supplemented rats, which coincided with an increased expression of the catalytic form of PP2A.

It has been described that increased p38-MAPK activity, by phosphorylating the tuberous sclerosis 2 gene product or tuberin, could release its inhibitory activity on mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) [39]. The mTOR signaling pathway transduces information from different signals, such as growth factors, amino acids and energy overload in the cell [40]. In accordance with an increased energy load and p38-MAPK activity, liver samples from 14-day fructose-supplemented rats showed a clear increase in the phosphorylated, activated form of mTOR. As it has been shown that mTOR activation causes IRS-2 degradation [41], the increase in mTOR activity could be the final factor resulting in the decreased liver expression of IRS-2 induced by fructose consumption. Furthermore, since p38-MAPK can phosphorylate FoxO1 [42], the increased p38-MAPK activity could explain the elevated amount of phosphorylated, inactive FoxO1 in the livers of 14-day supplemented rats despite the lack of insulin-mediated Akt activation.

FoxO1 presented two other anomalies in the livers of 14-day supplemented rats, namely a reduction in its total cellular amount and a nuclear localization, despite being hyperphosphorylated. A recent report demonstrated that XBP-1, an endoplasmic reticulum stress transcription factor, plays an essential role in maintaining plasma glucose concentration and glucose tolerance [32], interacting with FoxO1 and directing it toward proteasome degradation, as well as improving the control of plasma glucose concentrations even without enhancing insulin signaling. Moreover, it has been described that mTORC1 activity increases the splicing of XBP-1 [43], while p38-MAPK phosphorylates the splice-derived protein, facilitating its nuclear localization and activity [44]. Indeed, in accordance with the increased activity of mTOR and p38-MAPK, there was a marked increase in the spliced form of XBP-1 mRNA and nuclear protein in the livers of 14-day fructose-supplemented rats, thus giving a plausible explanation for the reduced amount of total FoxO1 protein in these samples.

FoxO1 activity can be regulated not only by phosphorylation but also by acetylation. Liu *et al.* described that acetylated-FoxO1, although displaying reduced transcriptional activity, is retained mainly in the nucleus [45]. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 controls metabolic processes in response to low nutrient availability [46], mediating the direct deacetylation of several transcription factors including FoxO1 [35]. Situations of energy overload, such as a high-fat diet, reduce SIRT1 expression and/or activity [47]. Consistently with the increased amount of energy consumed by fructose-supplemented rats, SIRT1 expression was significantly reduced in the livers of 14-day fructose-supplemented rats. As a consequence of the reduced deacetylation activity, the amount of acetylated-FoxO1 was increased in the same samples, thus explaining the increased nuclear localization of FoxO1 in the livers of fructose-supplemented rats.

The combined increases in the liver activities of malate dehydrogenase and malic enzyme could explain the increased liver output of glucose in 14-day fructose-supplemented rats submitted to the pyruvate tolerance test despite the reduced expression of both G6Pc and PEPCK. Nevertheless, this situation indicates that, in these animals, the altered ISI is not due to an increased output of liver glucose. New experiments should be performed in order to ascertain the existence of a state of skeletal muscle insulin resistance in 14-day fructose-supplemented rats. Decreased muscular consumption of glucose could explain the observed increase in the AUC for the glucose tolerance test in 14-day fructose-supplemented rats.

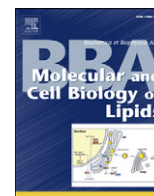
Further studies using chronic fructose supplementation should be performed in order to ascertain whether this situation persists in time or evolves to a typical liver insulin resistance with increased gluconeogenesis. This is an important issue, given the epidemiological evidence relating consumption of fructose-sweetened beverages over time and insulin resistance and type 2 diabetes mellitus in human populations.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.014>.

References

- [1] Fung TT, Malik V, Rexrode KM, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Sweetened beverage consumption and risk of coronary heart disease in women. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1037–42.
- [2] Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després J-P, Hu FB. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation* 2010;121:1356–64.
- [3] Hu FB, Malik VS. Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: Epidemiologic evidence. *Physiol Behav* 2010;100:47–54.
- [4] Alegret M, Roglans N, Laguna JC. Fructose consumption and leptin resistance: What have we learnt from animal studies? In: Hemling RM, Belkin AT, editors. *Leptin: Hormonal functions, dysfunctions and clinical uses*. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers Inc; 2011. p. 210–30.
- [5] Swarbrick MM, Stanhope KL, Elliott SS, Graham JL, Krauss RM, Christiansen MP, et al. Consumption of fructose-sweetened beverages for 10 weeks increases postprandial triacylglycerol and apolipoprotein-B concentrations in overweight and obese women. *Br J Nutr* 2008;100:947–52.
- [6] Welsh JA, Sharma A, Abramson JL, Vaccarino V, Gillespie C, Vos MB. Caloric sweetener consumption and dyslipidemia among US adults. *J Am Med Assoc* 2010;303:1490–7.
- [7] Choi HK, Willett W, Curhan G. Fructose-rich beverages and risk of gout in women. *J Am Med Assoc* 2010;304:2270–8.
- [8] Chen L, Caballero B, Mitchell DC, Loria C, Lin P-H, Champagne CM, et al. Reducing consumption of sugar-sweetened beverages is associated with reduced blood pressure. A prospective study among United States adults. *Circulation* 2010;121:2398–406.
- [9] Brown IJ, Stamler J, Van Horn L, Robertson CE, Chan Q, Dyer AR, et al. Sugar-sweetened beverages, sugar intake of individuals, and their blood pressure. International study of macro/micronutrients and blood pressure. *Hypertension* 2011;57:695–701.
- [10] Schulze MB, Manson JE, Ludwig DS, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, et al. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *J Am Med Assoc* 2004;292:927–34.
- [11] Maier IB, Stricker L, Özel Y, Wagnerberger S, Bischoff SC, Bergheim I. A low fructose diet in the treatment of pediatric obesity: A pilot study. *Pediatr Int* 2011;53:303–8.
- [12] Domínguez S, Cabrera A, Rodríguez MC, Borges C, Carrillo L, Almeida D, et al. Association between glycemic index, glycemic load, and fructose with insulin resistance: The CDC of the Canary Islands study. *Eur J Nutr* 2010;49:505–12.
- [13] Palmer JR, Boggs DA, Krishnan S, Hu FB, Singer M, Rosenberg L. Sugar-sweetened beverages and incidence of type 2 diabetes mellitus in African American women. *Arch Intern Med* 2008;168:1487–92.
- [14] Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després J-P, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010;33:2477–83.
- [15] de Koning L, Malik VS, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened and artificially sweetened beverage consumption and risk of type 2 diabetes in men. *Am J Clin Nutr* 2011;93:1321–7.
- [16] Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr* 1993;58(Suppl):754S–65S.
- [17] Vilà L, Roglans N, Perna V, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Alegret M, et al. Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose. *J Nutr Biochem* 2011;22:741–51.

- [18] Vilà L, Rebollo A, Adalsteisson GS, Alegret M, Merlos M, Roglans N, et al. Reduction of liver fructokinase expression and improved hepatic inflammation and metabolism in fructose-fed rats after atorvastatin treatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;251:32–40.
- [19] Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCalls S, Bruchette JL, Diehl AM, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2008;48:993–9.
- [20] Roglans N, Sanguino E, Peris C, Alegret M, Vázquez M, Adzet T, et al. Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor α expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:232–9.
- [21] Roglans N, Vilà L, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Laguna JC. Impairment of hepatic STAT-3 activation and reduction of PPAR α activity in fructose-fed rats. *Hepatology* 2007;45:778–88.
- [22] Vilà L, Roglans N, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Laguna JC. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism. *Hepatology* 2008;48:1506–16.
- [23] Stanhope KL, Schwartz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 2009;119:1322–34.
- [24] Stanhope KL, Bremer AA, Medici V, Nakajima K, Ito Y, Nakano T, et al. Consumption of fructose and high fructose corn syrup increase postprandial triglycerides, LDL-cholesterol, and apolipoprotein-B in young men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E1596–605.
- [25] Kim SK, Novak RF. The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol Ther* 2007;113:88–130.
- [26] Helenius M, Hänninen M, Lehtinen SK, Salminen A. Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF κ B transcription factor in mouse cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:487–98.
- [27] Bradford MM. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [28] Taguchi A, White MF. Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span. *Annu Rev Physiol* 2008;70:191–212.
- [29] Benito M. Tissue specificity on insulin action and resistance: Past to recent mechanisms. *Acta Physiol (Oxf)* 2011;201:297–312.
- [30] Fernandez-Marcos P, Auwerx J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr* 2011;93:884S–90S.
- [31] Kousteni S. FoxO1, the transcriptional chief staff of energy metabolism. *Bone* 2012;50:437–43.
- [32] Zhou Y, Lee J, Reno CM, Sun C, Park SW, Chung J, et al. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. *Nat Med* 2011;17:356–65.
- [33] Kume S, Thomas MC, Koya D. Nutrients sensing, autophagy, and diabetic nephropathy. *Diabetes* 2012;61:23–9.
- [34] Kyriakis JM, Ayruch K. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: A 10-year update. *Physiol Rev* 2012;92:689–737.
- [35] Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, et al. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab* 2008;8:347–58.
- [36] Hanke N, Schibe RJ, Manukjan G, Ewers D, Umeda PK, Chang K-C, et al. Gene regulation mediating fiber-type transformation in skeletal muscle cells is partly glucose- and ChREBP-dependent. *Biochim Biophys Acta* 1813;2011:377–89.
- [37] Kanuri G, Spruss A, Wagnerberger S, Bischoff SC, Bergheim I. Role of tumor necrosis factor α (TNF α) in the onset of fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. *J Nutr Biochem* 2011;22:527–34.
- [38] Volynets V, Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Bischoff SC, Bergheim I. Protective effect of bile acids on the onset of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *J Lipid Res* 2010;51:3414–24.
- [39] Li Y, Inoki K, Vacratsis P, Guan K-L. The p38 and MK2 kinase cascade phosphorylates tuberlin, the tuberous sclerosis 2 gene product, and enhances its interaction with 14-3-3. *J Biol Chem* 2003;278:13663–71.
- [40] Yap TA, Garret MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: Progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:393–412.
- [41] Guo S, Dunn SL, White MF. The reciprocal stability of FOXO1 and IRS2 creates a regulatory circuit that controls insulin signaling. *Mol Endocrinol* 2006;20:3389–99.
- [42] Asada S, Daitoku H, Matsuzaki H, Saito T, Sudo T, Mukai H, et al. Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate FoxO1. *Cell Signal* 2007;19:519–27.
- [43] Pfaffenbach KT, Nivala AM, Reese L, Ellis F, Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Rapamycin inhibits postprandial-mediated X-box-binding protein-1 splicing in rat liver. *J Nutr* 2010;140:879–84.
- [44] Lee J, Sun C, Zhou Y, Lee J, Gokalp D, Herrema H, et al. p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis. *Nat Med* 2011;17:1251–60.
- [45] Liu Y, Dentin R, Chen D, Hedrick S, Ravnskjaer K, Schenk S, et al. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature* 2008;456:269–73.
- [46] Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P. Metabolic adaptations through the PGC-1 α and SIRT1 pathways. *FEBS Lett* 2008;582:46–53.
- [47] Gillum MP, Erion DM, Shulman GI. Sirtuin-1 regulation of mammalian metabolism. *Trends Mol Med* 2011;17:8–13.



Liquid fructose downregulates Sirt1 expression and activity and impairs the oxidation of fatty acids in rat and human liver cells



Alba Rebollo^{a,1}, Núria Roglans^{b,c,1}, Miguel Baena^{b,c}, Rosa M. Sánchez^{b,c}, Manel Merlos^{b,c}, Marta Alegret^{b,c}, Juan C. Laguna^{b,c,*}

^a Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy, University of Barcelona, Spain

^b IBUB, Institute of Biomedicina University of Barcelona, Spain

^c CIBERobn (Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 September 2013

Received in revised form 13 December 2013

Accepted 6 January 2014

Available online 13 January 2014

Keywords:

PPAR α
Steatosis
Triglyceride
ChREBP

ABSTRACT

Fructose ingestion is associated with the production of hepatic steatosis and hypertriglyceridemia. For fructose to attain these effects in rats, simultaneous induction of fatty acid synthesis and inhibition of fatty acid oxidation is required. We aimed to determine the mechanism involved in the inhibition of fatty acid oxidation by fructose and whether this effect occurs also in human liver cells. Female rats were supplemented or not with liquid fructose (10% w/v) for 7 or 14 days; rat (FaO) and human (HepG2) hepatoma cells, and human hepatocytes were incubated with fructose 25 mM for 24 h. The expression and activity of the enzymes and transcription factors relating to fatty acid β -oxidation were evaluated. Fructose inhibited the activity of fatty acid β -oxidation only in livers of 14-day fructose-supplemented rats, as well as the expression and activity of peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α). Similar results were observed in FaO and HepG2 cells and human hepatocytes. PPAR α downregulation was not due to an osmotic effect or to an increase in protein-phosphatase 2A activity caused by fructose. Rather, it was related to increased content in liver of inactive and acetylated peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 α , due to a reduction in sirtuin 1 expression and activity. In conclusion, fructose inhibits liver fatty acid oxidation by reducing PPAR α expression and activity, both in rat and human liver cells, by a mechanism involving sirtuin 1 down-regulation.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

There is a world-wide pandemic of human diseases, such as obesity, related to an unbalanced energy intake. Further, the International Diabetic Federation projects 380 million adults suffering type-2 diabetes mellitus (T2DM) by the year 2025 [1]. There is also increased prevalence of risk factors for obesity and T2DM, such as hepatic steatosis [2] and hypertriglyceridemia [3].

Epidemiological evidence suggests a causal association with the consumption of sugar-sweetened beverages by human populations [1,4]; fructose is used as a sweetener in liquid beverages [1,4,5]. High energy intake, lack of adequate energy compensation and the special metabolism of fructose have been reported as reasons to explain this association [1,5]. Fructose ingestion is also associated with the production of hypertriglyceridemia [6] and hepatic steatosis [7].

In vitro studies suggest that fructose directly inhibits the oxidation of fatty acids in rat liver mitochondria [8]. We showed, in a rat model of liquid-sugar feeding, that to induce hypertriglyceridemia and hepatic steatosis, a simultaneous induction of fatty acid synthesis and inhibition of fatty acid β -oxidation is required [9,10]. The reduction in the activity of the hepatic fatty acid β -oxidation system by fructose correlated with a decrease in the expression and activity of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), a nuclear receptor that plays a key role in the transcriptional control of genes encoding fatty acid β -oxidation enzymes [9,10]. Fructose, but not glucose, despite the latter being ingested in identical quantity, was the only sugar able to induce these changes [9]. The mechanisms by which fructose inhibits the PPAR α system are not fully elucidated. Recently, Ravnskjaer et al. proposed that glucose inhibits PPAR α in pancreatic cells by activating protein phosphatase 2 A (PP2A) [11]. PP2A is also activated by other carbohydrates,

Abbreviations: ACO, acyl-CoA oxidase; AMPK, AMP-activated protein kinase; APRT, adenosyl phosphoribosyl transferase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; ChREBP, carbohydrate response element binding protein; CYP4A1, cytochrome P450 4A1; FAS, fatty acid synthase; Foxa2, forkhead box protein A2; GK, glucokinase; GPAT1, glycerol phosphate acyltransferase 1; HNF4, hepatic nuclear factor 4; L-CPT-I, liver carnitinepalmitoyl-CoA transferase I; L-PK, liver-pyruvate kinase; NAMPT, nicotinamide phosphoribosyltransferase; PGC-1 α , peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 α ; PP2A, protein phosphatase 2 A; PPAR α , peroxisome proliferator activated receptor α ; SCD1, stearoyl-CoA desaturase 1; SIRT1, sirtuin 1; SREBP1, sterol response element binding protein 1; T2DM, type 2 diabetes mellitus; Trib-3, mammalian tribbles homolog-3; TSA, trichostatin A

* Corresponding author at: Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy, University of Barcelona, Avda. Diagonal 643, Barcelona 08028, Spain. Tel.: +34 93 4024530x13; fax: +34 93 4035982.

E-mail address: jclagunae@ub.edu (J.C. Laguna).

¹ A Rebollo and N Roglans contributed equally to this work.

such as fructose, through a common metabolite, xylulose-5-phosphate [10].

Sirtuin 1 (SIRT1) is a NAD⁺-dependent deacetylase that modulates the functions of many proteins involved in the process of aging and metabolic disorders. SIRT1 is activated by caloric restriction and selective drug activators [12,13]. Feige et al. [14] demonstrated that activation of SIRT1 in skeletal muscle and liver enhanced fatty acid oxidation, protecting from diet-induced fatty liver, obesity and insulin-resistance. The aim of our study was to investigate the effect of fructose supplementation on female Sprague–Dawley rats, rat (FaO) and human (HepG2) hepatoma cells and human hepatocytes. We examined liver transcription factors and enzymes controlling PPAR α and fatty acid oxidation, including SIRT1 expression and activity.

2. Material and methods

2.1. Animals and experimental design

Female Sprague–Dawley rats (Charles River, Barcelona, Spain), were maintained at constant humidity and temperature, with a light/dark cycle of 12 h, and had ad libitum access to water and to a regular diet (calories from fat 18%, from protein 24% and from carbohydrate 58%, cat. 2018, Harlan Teklad). Rats were randomly assigned to a control group and a fructose-supplemented group (8 and 12 rats per group, respectively). Fructose was supplied as a 10% (weight/volume) solution in drinking water for 7 and 14 days. Then, food and fructose were removed at 8 a.m. and the animals were killed by decapitation under isoflurane anesthesia at 10 a.m. To reduce variability in plasma estrogen concentrations, female rats were killed during the diestrus period.

Blood and liver tissue samples were collected and stored as described elsewhere [9]. All procedures were conducted in accordance with the guidelines established by the University of Barcelona's Bioethics Committee (Autonomous Government of Catalonia's Act 5/1995, July 21).

2.2. Cell culture

Rat hepatoma FaO cells from the European Collection of Cell Cultures (ECACC) were cultured in low-glucose DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS Gold, PAA) and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin, Invitrogen). At 80% confluence, serum was reduced to 1%. Cells were incubated in the absence or presence of fructose, glucose or mannitol (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) at 25 mM for 24 h [10]. Human hepatoma HepG2 cells from the EuCellBank (Barcelona, Spain) were cultured as FaO cells. Human hepatocytes (*Ready Heps™ Fresh Hepatocytes*) were from Lonza (Basel, Switzerland). They were cultured and treated in HMM™ medium (*Hepatocyte Medium Maintenance System* from Lonza). In some experiments, 100 μ M of Wy-14643, a PPAR α agonist (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), and 20 nM of Okadaic acid, a potent inhibitor of PP2A phosphatase, (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) were added 3 h and 30 min, respectively, before fructose. 100 nM of the specific SIRT-1 activator SRT1720 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) was added to the medium 12 h after fructose supplementation.

2.3. Sample preparations

Total and nuclear extracts from rat liver and cells were isolated by the Helenius method [15]. Protein concentrations were determined by the Bradford method [16].

2.4. Lipids and leptin analysis

Plasma triglycerides were measured by the Triglyceride L-Q test (Spinreact, Girona, Spain). Plasma leptin was determined with the RL-

83K RIA kit (Millipore, Bedford, MA, USA). Liver triglycerides were extracted and measured as described by Roglans et al. [17].

2.5. Enzyme activity assays

Hepatic fatty acid β -oxidation activity was determined in rat livers, as in [18], with 30 μ g of postnuclear supernatant. PP2A activity in FaO cells was determined by the colorimetric kit *Sensolyte pNPP Protein Phosphatase Assay Kit* (AnaSpec, Fremont, CA, USA). A co-immunoprecipitation, using 100 μ g of total protein and 4 μ g of anti-PP2A antibody (Millipore, Bedford, MA, USA), was conducted to purify the PP2A protein. SIRT1 activity was analyzed in FaO cells by the *HDAC Fluorimetric Cellular Activity Assay* (BML-AK503, Enzo Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA). To evaluate SIRT-1 activity selectively, TSA (trichostatin A, 1 μ M, 12 h) was used as a non-sirtuin deacetylase inhibitor.

2.6. RNA preparation and analysis

Total RNA was isolated by using the Trizol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Specific mRNAs were assessed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) [17]. As internal control, adenosyl phosphoribosyl transferase (APRT) was used for samples from 14-day fructose-supplemented rats and FaO cells and 18 s was used for HepG2, human hepatocytes and 7-day fructose-supplemented rats. The number of cycles, primer sequences, and resulting PCR products are listed in Supplementary Table 1. The mRNA levels were always expressed as the ratio to APRT or 18 s mRNA levels.

2.7. Western blot analysis

Total and nuclear proteins (10 to 30 μ g from rat livers and 10 to 20 μ g from cells) were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis [9,10]. Proteins were then transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride transfer membranes (Millipore, Bedford, MA) and blocked for 1 h at room temperature with 5% non-fat milk solution in TBS-0.1% Tween-20. Membranes were then incubated with the primary polyclonal antibody raised against ACC (dilution 1:1000), ChREBP, Foxa2, HNF4 and NAMPT (dilution 1:500), PP2Ac, PPAR α (dilution 1:1000), SIRT1 (dilution 1:500) and SREBP-1c (dilution 1:200). Incubations with primary antibodies were performed in TBS-0.1%Tween-20 with 5% non-fat milk (except for ACC, NAMPT and PP2Ac determination, which used 5% bovine serum albumin) at 4 °C overnight. After several washes, they were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG or anti-goat IgG (1:3000 dilution) for ChREBP determination. Detection was achieved using the ECL chemiluminescence kit for horseradish peroxidase (Amersham Biosciences). The size of detected proteins was estimated using protein molecular-mass standards (Invitrogen, Life Technologies). Antibodies were from Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, Texas, USA), except those for phospho- and total ACC which were from Cell Signaling (Danvers, MA, USA) and PPAR α from AbCam (Cambridge, UK).

2.8. Co-immunoprecipitation

100 μ g of nuclear extracts from rat livers were incubated with 4 μ g of anti-acetylated-lysine antibody in a final volume of 0.5 mL with buffer containing 10 mM PBS and 2% BSA for 4 h at 4 °C. Immunocomplexes were captured by incubating with protein A/G Plus-agarose suspension (Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4 °C on a rocker platform. Beads were collected by centrifugation at 1000 \times g for 5 min. and washed three times with PBS-containing protease, deacetylase and phosphatase inhibitors. After microcentrifugation, the pellet was resuspended with 40 μ l of SDS-PAGE sample buffer and boiled for 5 min at 100 °C. The supernatant was electrophoresed on 8% SDS-PAGE and immunoblotted with an antibody against ChREBP (Santa Cruz Biotechnologies) and PGC-1 α (Cayman).

2.9. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

8 µg of nuclear extracts from FaO cells and rat livers were incubated with a PPRE-L-CPT-I probe obtained from the annealing of single-stranded complementary oligonucleotides spanning nucleotides –266 to –290 of the rat L-CPT-I gene (5'-AGTACGGGCATGGAGCAAAGAGCT-3'), exactly as described elsewhere [19].

2.10. Histological studies

Lipid accumulation, necrosis and fibrosis were analyzed in liver sections stained with Oil Red O, hematoxylin-eosin and trichromic acid, respectively. Images, acquired with an Olympus BX43 microscope, were interpreted at the BioBanc (Banc de tumors-IDIBAPS, Barcelona Spain).

2.11. Statistics

The results are expressed as the mean of *n* values ± standard deviation. Plasma samples were assayed in duplicate. Significant differences were established by the unpaired *t*-test or the one-way ANOVA test, with analysis afterwards (GraphPad Software V2.03). When the number of samples was too small or variance was not homogeneous, a non-parametric test was performed. The level of statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Fourteen-day fructose supplementation to rats is necessary to induce fatty liver and hypertriglyceridemia

Fructose-supplemented rats drank more liquid, reducing their ingestion of solid food ($\times 0.78$ -fold). The induction of liver fructokinase, which controls the amount of fructose metabolized by cells [20], was the same at 7 and 14 days ($\times 2.0$ -fold). Thus, rats increased their calorie intake in a similar way from 726.4 to 904.4 kcal/7days/2 rats (increase of 1.24-fold) and from 1609.6 to 2052.4 kcal/14 days/2 rats ($\times 1.27$ -fold), at 7 and 14 days, respectively. The increase was mainly due to calories obtained from fructose, which represented a 37 and 39% of the total calories consumed at 7 and 14 days, respectively. This increase was not compensated by a sufficient reduction in the ingestion of solid food. Visceral adipose tissue and body weight were not modified (Table 1). Despite this, only 14-day fructose-supplemented rats increased their percentage of liver weight ($\times 1.2$ -fold), liver triglycerides ($\times 1.9$ -fold), plasma triglycerides ($\times 1.5$ -fold) and adiponectin levels ($\times 1.7$ -fold) with unmodified plasma leptin levels (Table 1). While no clear signs of necrosis or fibrosis were detected, liver steatosis was confirmed by histological analysis (Fig. 1). Thus, we proceeded to determine liver fatty acid synthesis and liver fatty acid β -oxidation in livers of female fructose-supplemented rats.

Table 1
Fructose effects on liquid and food ingestion, triglyceride and leptin plasma analytes, liver triglycerides and body and tissue weight values and fructokinase protein levels at 7 and 14 days.

	7 days		14 days	
	Control (n = 4)	Fructose (n = 6)	Control (n = 4)	Fructose (n = 6)
AUC ingested liquid (ml/days/2 rats)	360 ± 8	845 ± 198*	706 ± 91	1995 ± 430*
AUC consumed diet (g/days/2 rats)	227 ± 2	177 ± 13**	503 ± 12	392 ± 44*
AUC body weight (g/days/rat)	1478 ± 53	1495 ± 94	3575 ± 380	3687 ± 257
Final body weight (g)	249.5 ± 7.0	257.0 ± 19.4	263.7 ± 25.9	276.7 ± 20.7
Adipose tissue weight (g)	1.49 ± 0.69	1.53 ± 0.69	1.92 ± 1.24	2.57 ± 1.05
% liver weight	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.3	3.2 ± 0.2	3.8 ± 0.2**
FK protein (a.u.)	1 ± 0.32	1.78 ± 0.28**	1 ± 0.17	2.18 ± 0.20**
Hepatic triglycerides (mg/g liver)	6.8 ± 0.6	8.2 ± 3.0	4.1 ± 2.3	7.7 ± 2.4*
Plasma triglycerides (mg/dl)	58 ± 27	57 ± 13	63 ± 12	94 ± 17**
Plasma leptin (ng/ml)	2 ± 1	3.2 ± 2.3	2.8 ± 2.7	4.7 ± 2.2
Plasma adiponectin (µg/ml)	2.7 ± 0.7	3.9 ± 1.5	2.3 ± 0.7	4.0 ± 0.7*

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$.

3.2. Seven days of fructose supplementation suffices to increase the expression of markers of liver fatty acid synthesis

Fructose similarly increased the liver expression of carbohydrate response element binding protein (ChREBP) and its target genes related to fatty acid synthesis [21] liver-pyruvate kinase (L-PK), fatty acid synthase (FAS), stearoyl-CoA desaturase (SCD1), glycerol phosphate acyltransferase 1 (GPAT1), acetyl-CoA carboxylase (ACC), and elongation of very long chain fatty acids family member 6 (Elovl6), after 7- and 14-day supplementation (Table 2). As we showed elsewhere [10,20], the expression of the mature form of sterol response element binding protein 1 (SREBP1) and its target gene glucokinase (GK) [22], was not modified (Table 2).

3.3. Fructose induces a bimodal change in the expression and activity of PPAR α and its target genes

Liver PPAR α expression increased after 7-day supplementation of fructose to rats, while after 14 days, its expression was repressed at $\times 0.75$ -fold (Table 3). The expression of PPAR α target genes, such as liver-carnitine palmitoyl-CoA transferase-I (L-CPT-I), acyl-CoA oxidase (ACO), and the mammalian tribbles homolog-3 (Trib-3) [23,24], followed a similar pattern (Table 3), pointing to a similar bimodal change (increase–decrease) in the activity of PPAR α . In accordance, the specific retention bands produced after incubation of liver nuclear extracts with an oligonucleotide reproducing the peroxisome proliferator response element (PPRE) of rat L-CPT-I showed a similar change in intensity after 7- and 14-day fructose supplementation (Fig. 2A). On the other hand, the expression of total and phosphorylated AMP-activated protein kinase (AMPK), an enzyme which increases fatty acid oxidation in hepatic cells, was not modified (Table 3).

Surprisingly, the activity of the liver fatty acid β -oxidation system, under the transcriptional control of PPAR α [25], was similarly reduced at $\times 0.55$ -fold after 7- and 14-day fructose supplementation (Fig. 2B). To investigate the mechanisms by which fructose inhibits fatty acid β -oxidation, despite opposite changes in PPAR α , we assessed the phosphorylation of ACC. Our results showed increased expression of total and phosphorylated ACC at both 7 and 14 days (Table 2), implying increased production of malonyl-CoA, a known allosteric inhibitor of L-CPT-I that controls the whole fatty acid β -oxidation system [26]. On the other hand, we assessed the expression of the regulator of G protein signaling 16 (RGS16), a physiological inhibitor of the fatty β -oxidation system [27]. Livers of 7- and 14-day fructose supplemented rats had increased expression of RGS16 (Fig. 2C), but the protein expression was not modified at any time (Fig. 2D).

To avoid variability in response due to fluctuations in the amount of sugar ingested in the in vivo studies, we assessed the PPAR α system after the incubation of rat liver cells with fructose.

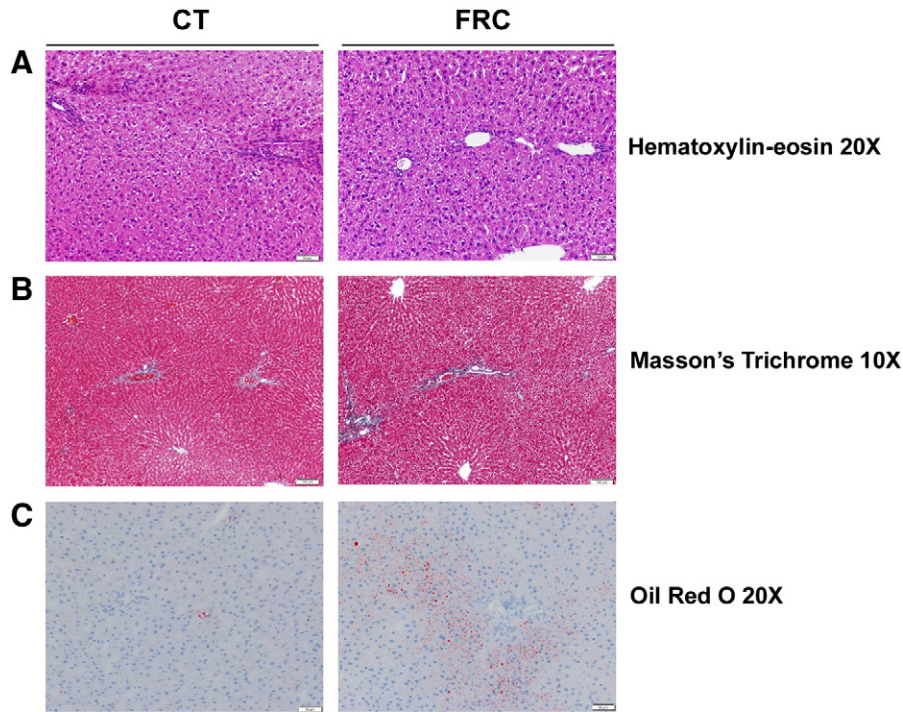


Fig. 1. Histological study of liver sections from control and 14-day fructose-supplemented rats: Livers were cryosectioned and processed for histological examination of inflammation, collagen deposition and fat infiltration. Images are representative of liver sections from control (n = 4) and fructose-supplemented rats (n = 4) stained with H&E (A), trichrome Masson (B) and oil red O (C).

3.4. Fructose represses PPARα expression and activity in liver cells from rat and human origin

FaO rat hepatoma cells incubated for 24 h with fructose 25 mM showed a reduction in the expression of PPARα and two of its target genes, ACO and cytochrome P450 4A1 (CYP4A1) (Figs. 3A–C). This was not produced by an osmotic shock, as a similar concentration of mannitol induced no change in the expression of these genes (Figs. 3A–C), and was specific to fructose, as glucose induced no significant changes (Figs. 3A–C), in accordance with our previous results in vivo [9].

As the production of PPARα ligands is probably minimal in cultured cells, we assessed the effect of fructose in the presence of Wy-14,643, a potent and specific PPARα ligand [28]. 25 mM fructose incubation for 24 h significantly reduced the induction of L-CPT-I, ACO and CYP4A1

elicited by Wy-14,643 (Figs. 3D–F). When we assayed the specific binding of FaO cell nuclear extracts to an oligonucleotide reproducing the PPRE of rat L-CPT-I, we observed a major band whose intensity was depressed in the presence of Wy-14,643 and further increased in the presence of fructose (Fig. 3G). In naïve FaO cells, the PPRE in the L-CPT-I promoter is mainly occupied by an unproductive protein complex that drops in the presence of Wy-14,643, favoring the expression of L-CPT-I, and increases further on co-incubation with fructose, thus reducing the expression of L-CPT-I.

To determine whether fructose had similar effects in human cells, we incubated human HepG2 hepatoma cells and normal human hepatocytes for 24 h with fructose 25 mM. Fructose reduced the expression of PPARα and L-CPT-I in the presence and in the absence of Wy-14,643 in these human liver cells, implying a similar effect of fructose on PPARα in rats and humans (Fig. 4).

Table 2
Expression of genes/proteins involved in lipogenic pathways after 7- and 14-day fructose supplementation.

Gene	7 days		14 days	
	Control (n = 4)	Fructose (n = 5)	Control (n = 4)	Fructose (n = 5)
Fas	1 ± 0.20	6.28 ± 5.34**	1 ± 0.39	4.66 ± 1.52**
Gk	1 ± 0.34	1.09 ± 0.62	1 ± 0.43	1 ± 0.46
Gpat1	1 ± 0.26	1.57 ± 0.18**	1 ± 0.04	1.74 ± 0.81**
L-pk	1 ± 0.29	1.59 ± 0.14**	1 ± 0.05	2.12 ± 0.64**
Scd1	1 ± 0.52	11.98 ± 5.06**	1 ± 0.39	4.39 ± 2.53*
Elovl6	1 ± 0.40	2.88 ± 1.47*	1 ± 0.35	5.29 ± 1.73*
<i>Protein</i>				
p-ACC	1 ± 0.25	1.78 ± 0.11**	1 ± 0.10	1.28 ± 0.19*
ACC	1 ± 0.27	2.01 ± 0.15**	1 ± 0.16	1.49 ± 0.36*
ChREBP	1 ± 0.14	1.15 ± 0.23	1 ± 0.36	2.01 ± 0.87*
PP2Ac	1 ± 0.07	0.9 ± 0.08	1 ± 0.13	1.28 ± 0.15**
SREBP-1c 68KD	1 ± 0.12	0.80 ± 0.14	1 ± 0.24	1.12 ± 0.16

* P < 0.05.
** P < 0.01.

Table 3
Expression of genes/proteins involved in fatty acid oxidation pathways after 7- and 14-day fructose supplementation.

Gene	7 days		14 days	
	Control (n = 4)	Fructose (n = 5)	Control (n = 4)	Fructose (n = 5)
<i>L-cpt-1</i>	1 ± 0.48	1.68 ± 0.69	1 ± 0.37	0.56 ± 0.21*
<i>Aco</i>	1 ± 0.09	1.26 ± 0.12**	1 ± 0.02	0.80 ± 0.11*
<i>Trib-3</i>	1 ± 0.61	3.34 ± 0.89**	1 ± 0.25	0.65 ± 0.21**
<i>Pparα</i>	1 ± 0.72	2.08 ± 0.40*	1 ± 0.27	0.36 ± 0.22**
<i>Protein</i>				
PPARα	1 ± 0.50	1.10 ± 0.44	1 ± 0.12	0.75 ± 0.16*
p-AMPK	1 ± 0.32	1.06 ± 0.20	1 ± 0.24	0.91 ± 0.14
AMPK	1 ± 0.34	0.98 ± 0.17	1 ± 0.28	1.28 ± 0.20
HNF4	1 ± 0.51	1.76 ± 0.49*	1 ± 0.23	0.52 ± 0.19**
<i>Foxa2</i>	1 ± 0.16	1.13 ± 0.20	1.1 ± 0.11	0.87 ± 0.12*

* P < 0.05.
** P < 0.01.

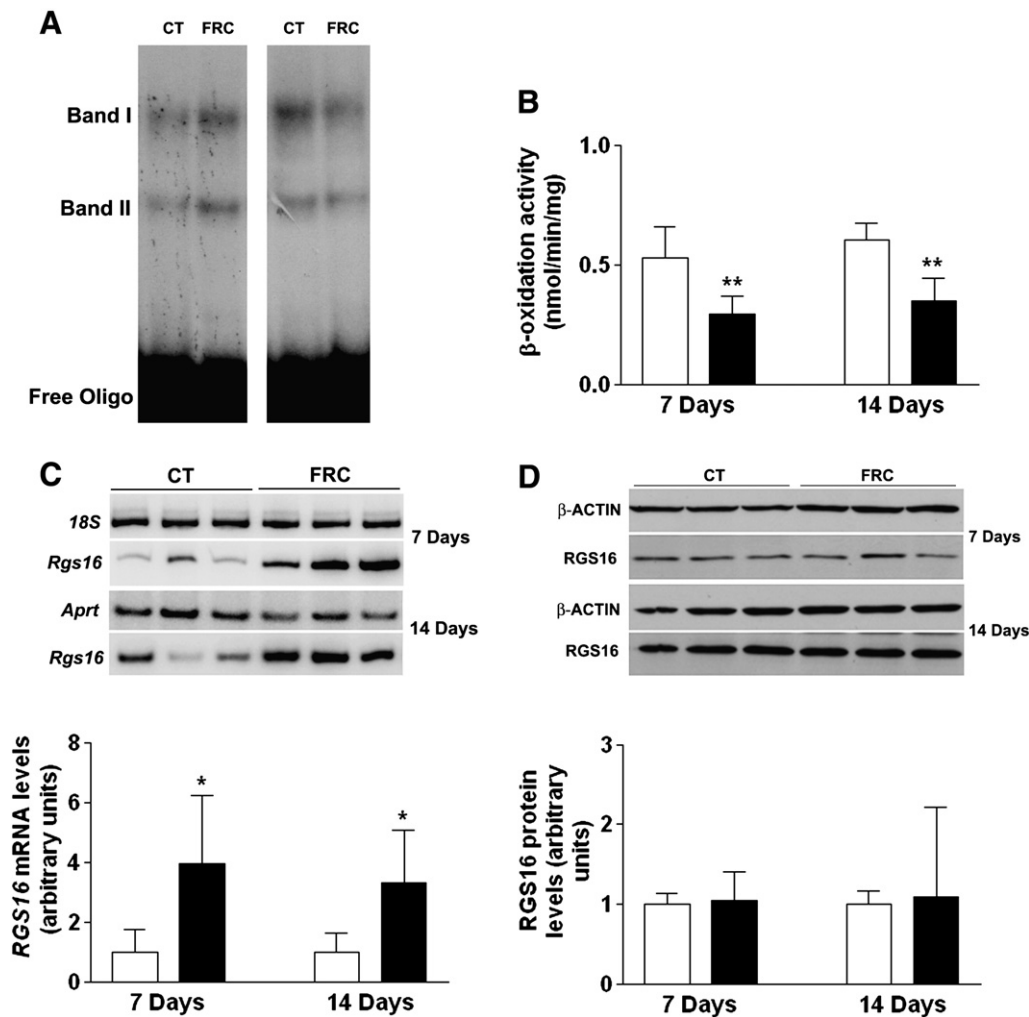


Fig. 2. In vivo effect of fructose on rat liver binding to a PPRE oligonucleotide, fatty acid β -oxidation activity and RGS16 expression: (A) Representative EMSA autoradiography showing the binding of pooled nuclear extracts (NE) from control ($n = 4$) and fructose-supplemented rats ($n = 6$) to a PPRE oligonucleotide. (B) Fatty acid β -oxidation activity, expressed as nmols of oxidized palmitoyl-CoA/min/mg of protein in liver postnuclear supernatant, in control ($n = 4$) and fructose-supplemented ($n = 6$) rats. (C) mRNA of RGS16 in control and fructose-supplemented rats. Each bar represents the mean \pm sd of values obtained from $n = 4$ and $n = 5$ animals (for control and fructose groups, respectively). The autoradiography above the figure shows the bands corresponding to Rgs16 mRNA and that of the aprt gene, used as an internal control in the PCR reaction to normalize the results, from liver samples of 3 animals from each treatment group. (D) Bar plot showing the levels of RGS16 protein in hepatic samples from control and fructose-supplemented rats. Each bar represents the mean \pm sd of values obtained from $n = 4$ and $n = 5$ animals (for control and fructose groups, respectively). Above the figure, a representative Western blot shows the RGS16 bands corresponding to 3 different control and fructose-fed rats.* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3.5. Protein Phosphatase 2A (PP2A) activity is not involved in the reduction of PPAR α expression and activity by fructose

ChREBP dephosphorylated by PP2A is retained in the nucleus, increasing the transcription of its target genes, such as L-PK or RGS16 [21]. Sustained activation of PP2A by fructose could be responsible, through ChREBP activation, for the reduced expression and activity of PPAR α . Only livers from 14-day fructose-supplemented rats showed an increase in the ChREBP protein ($\times 2.01$ -fold) and in the catalytic subunit of PP2A ($\times 1.28$ -fold) (Table 2). To test this hypothesis, we determined the effect of fructose on these parameters in FaO cells.

Incubation of FaO cells with 25 mM fructose for 24 h increased the expression and activity of PP2A and ChREBP (Fig. 5A–B). Only fructose, but not glucose, was able to induce significantly the expression of L-PK ($\times 2.06$ -fold), a prototypical ChREBP-driven gene, in FaO cells (Fig. 5E). When FaO cells were incubated with okadaic acid, a known inhibitor of PP2A [29], although the fructose-induced increase in PP2A activity was blunted, the effect of fructose on ChREBP, L-PK and PPAR α was preserved (Fig. 5A–D).

3.6. Fructose supplementation reduces liver SIRT1 expression and activity

The liver expression of hepatic nuclear factor 4 (HNF4), a transcription factor also controlling the expression of L-CPT-I [30], paralleled that of PPAR α . The expression of forkhead box protein A2 (Foxa2) [31], a transcription factor regulating fatty acid oxidation, was reduced only after 14-day fructose supplementation ($\times 0.79$ fold) (Table 3).

We found only in livers of 14-day fructose-supplemented rats a reduction in SIRT1 ($\times 0.36$ -fold, Fig. 6A) and nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT, $\times 0.73$ -fold, Fig. 6B), an enzyme essential for the synthesis of NAD $^{+}$, suggesting a deficit of SIRT1 activity, which could be responsible for the reduction in the expression and activity of the PPAR α system.

Although in FaO cells incubation with 25 mM fructose for 24 h did not modify the expression and activity of SIRT1 and NAMPT (data not shown), fructose was also able to efficiently block the increase in PPAR α expression induced by incubating FaO cells with SRT1720, a potent and selective activator of SIRT1 [32] (Fig. 6C).

To confirm the reduction of SIRT1 activity in vivo by fructose, we determined the amount of the acetylated form of a well-known substrate

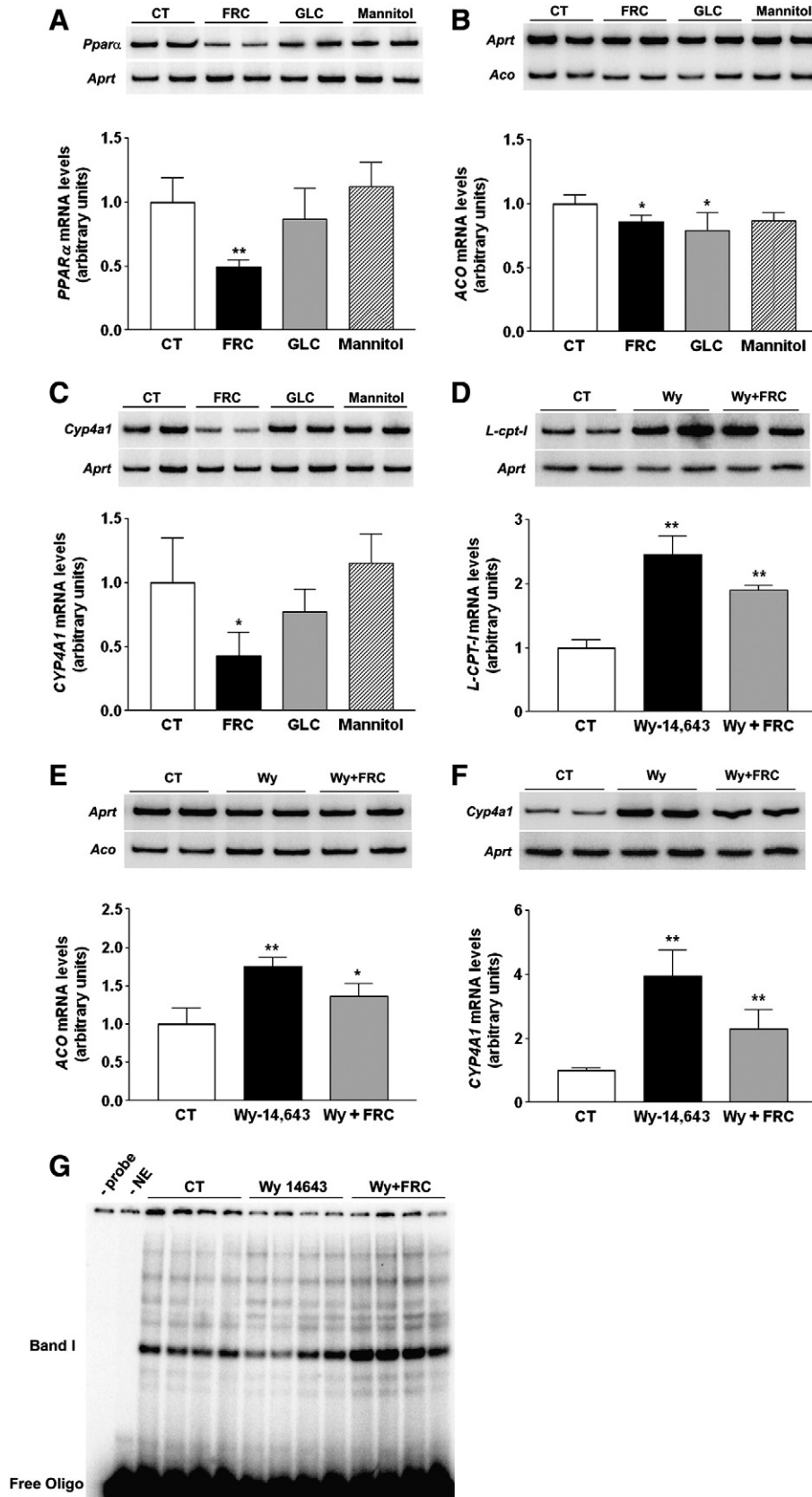


Fig. 3. Fructose represses PPAR α expression and activity in FaO rat hepatoma cells: The mRNA levels of PPAR α (A), ACO (B, D), CYP4A1(C, F) and L-CPT-I (E) in control (CT) or in FaO cells cultured with 25 mM fructose (FRC), 25 mM glucose (GLC), 25 mM mannitol, 100 μ M Wy-14,643 or fructose plus Wy-14,643 for 24 h. Each bar represents the mean \pm sd of three different assays performed in duplicate. (G) Representative EMSA autoradiography showing the binding of nuclear extracts (NE) from control, Wy-14,643 and Wy-14,643 plus fructose-treated FaO cells to a PPRE oligonucleotide. *P < 0.05; **P < 0.01.

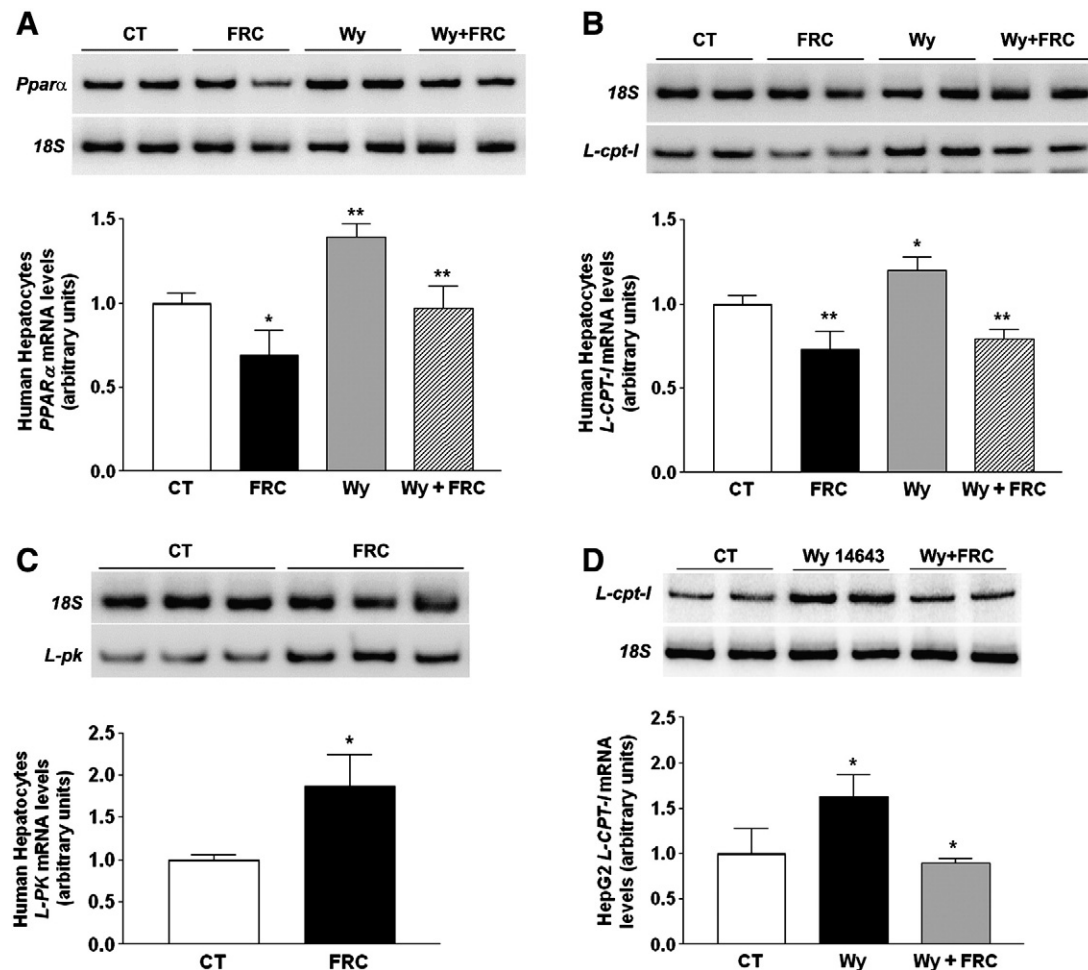


Fig. 4. Fructose represses PPAR α expression and activity in human liver cells: mRNA of PPAR α (A), L-CPT-1 (B) and L-PK (C) in human hepatocytes, and L-CPT-1 (D) in HepG2 cells in control cells (CT) or in cells treated with fructose (FRC), Wy-14.643, or fructose plus Wy-14.643. Each bar represents the mean \pm sd of three different assays performed in duplicate. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

of SIRT1 activity, peroxisome proliferator activated receptor coactivator 1 α (PGC-1 α) [13]. The amount of acetylated-PGC-1 α was clearly increased in livers of 14-day fructose-supplemented rats (Fig. 6D).

4. Discussion

We showed that hypertriglyceridemia and fatty liver after carbohydrate ingestion in rats result from simultaneous induction of liver fatty acid synthesis and inhibition of fatty acid oxidation [9,10,20]. Simple sugars induce lipid synthesis, but only fructose, at least in rats, inhibits liver fatty acid oxidation. Here, we demonstrate that fructose inhibits hepatic fatty acid oxidation at both 7 and 14 days of supplementation (10% w/v) but through different mechanisms, involving the reduction of PPAR α expression only at the latter time-point. In fact, at 7 days fructose supplementation increases PPAR α expression and activity, and the reduction in fatty acid β -oxidation may be related to increased ACC expression leading to the production of malonyl-CoA and to CPT-1 inhibition. On the contrary, fructose supplementation for 14 days inhibits liver fatty acid β -oxidation also by reducing PPAR α expression and activity, mainly by decreasing the expression and activity of SIRT1. This fructose-related inhibition of PPAR α is reproduced in human HepG2 hepatoma cells and in human hepatocytes.

Activation of SIRT1 protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fatty acid oxidation [14]. This effect could be mediated by two complementary mechanisms: 1. Activation of AMPK [33], which we can rule out from our present results, and 2. deacetylation and activation of PGC-1 α [34], a cofactor of PPAR α necessary for the

transcriptional control of genes related to fatty acid oxidation [35]. Conversely, hepatocyte-specific deletion of SIRT1 impairs PPAR α signaling and decreases fatty acid β -oxidation [36]. We showed that there was a reduction in SIRT1 expression, as well as in nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), the rate-limiting enzyme in NAD $^{+}$ biosynthesis [37], pointing to a decrease in SIRT1 activity in the livers of 14-day fructose-supplemented rats. Consistently, a well-known substrate of SIRT-1, PGC-1 α , remained hyperacetylated in the same samples. The inactivity of acetylated PGC-1 α could be responsible for the reduced expression and activity of PPAR α and the fatty acid β -oxidation system. However, fructose incubation of FaO cells, despite reducing PPAR α expression, did not reduce SIRT1 and NAMPT. Nevertheless, FaO cells were incubated with fructose for 24 h, in comparison with the 14-day fructose supplementation in rats. Moreover, the fluorimetric assay used to detect SIRT1 is designed for evaluation of total deacetylase activity and not specifically the SIRT1 activity present in a complex cellular mixture. Thus, it is relevant that the incubation of FaO cells with a SIRT1 agonist, SIRT1720 [14], increased PPAR α expression, an effect that was blunted by fructose. In FaO cells, a short incubation period with fructose is not sufficient to repress the expression of SIRT1, but probably reduces its deacetylase activity strongly enough to reduce the expression of PPAR α .

The mechanism involved in the fructose-mediated reduction of SIRT1 expression remains to be determined. Our results suggest ChREBP as a potential candidate. It has been previously suggested that ChREBP is activated by fructose-induced PP2A activity. Previous work by Dentin et al. [38] and our present data suggest that this is not the case, given that in our in vitro studies okadaic acid inhibited PP2A activity without

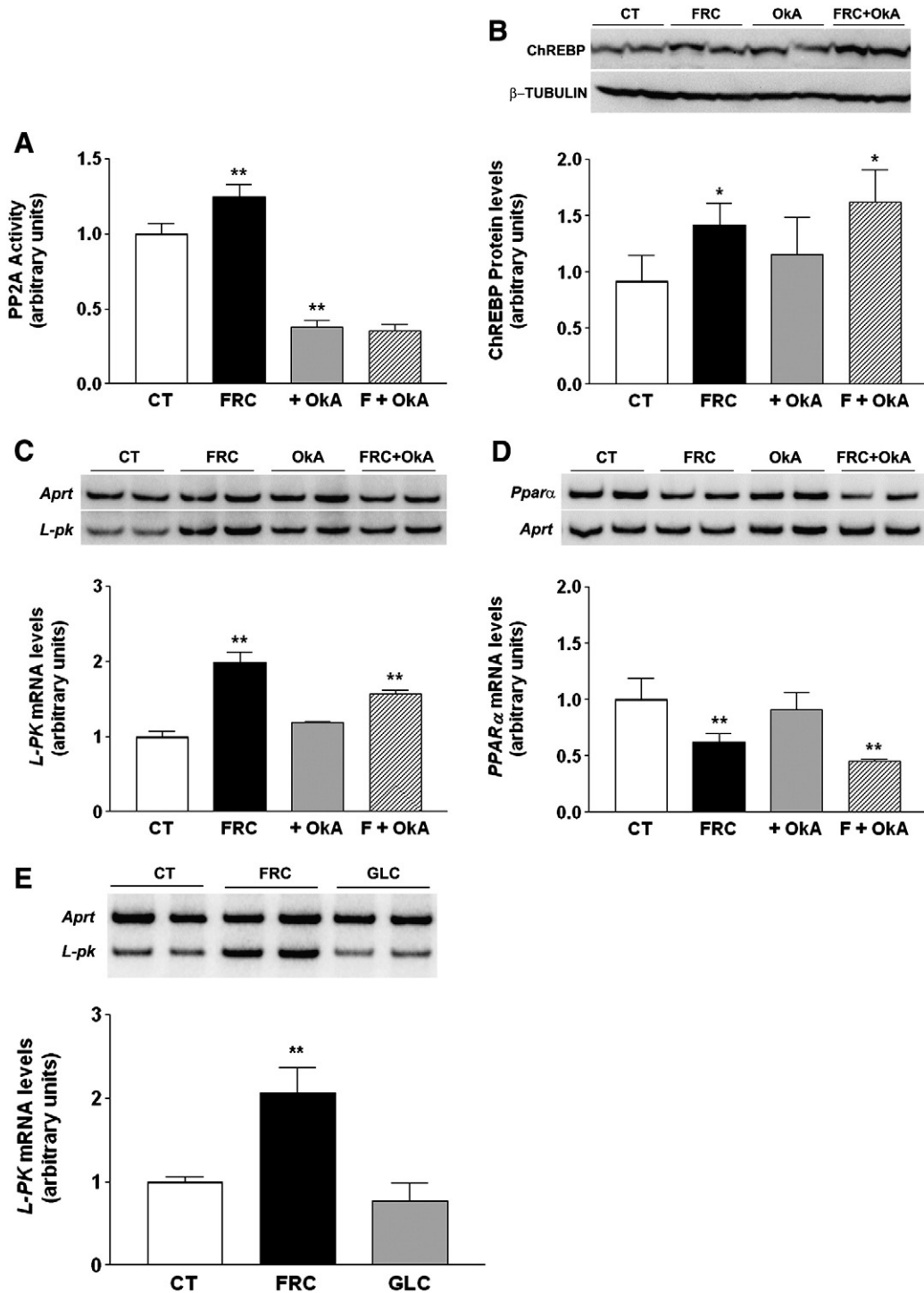


Fig. 5. Protein Phosphatase 2A (PP2A) activity is not involved in the reduction of PPAR α expression and activity by fructose: (A) PP2A activity, ChREBP protein (B) and L-PK (C) and PPAR α (D) mRNA in FaO cells incubated in the absence (CT) or in the presence of 25 mM fructose (FRC), 20 nM okadaic acid (OkA) or 25 mM fructose plus 20 nM okadaic acid (F + OkA) for 24 h. (E) mRNA of L-PK in control cells (CT) or in cells treated with 25 mM fructose (FRC) or 25 mM glucose (GLC) for 24 h. Each bar represents the mean \pm sd of three different assays performed in duplicate. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs CT; # $p < 0.01$ vs FRC.

changing the effect of fructose on target genes. It has also been suggested that ChREBP indirectly represses the liver expression of PPAR α -target genes through the increased expression of RGS16 [27]. However, although we observed increased mRNA levels of RGS16 in fructose-fed rats, protein levels were not modified by the treatment, suggesting that the effects of fructose on genes controlled by PPAR α is independent from RGS16. Moreover, Boergesen et al. [39] showed that glucose reduces PPAR α expression in pancreatic β -cells, but not in rat hepatoma FaO cells, by activating ChREBP. We found that glucose does

not increase the expression of the *l-pk* gene in FaO cells (Fig. 5E), suggesting a lack of ChREBP activation. On the contrary, fructose efficiently increased the expression of the *l-pk* gene in FaO cells and human hepatocytes (Fig. 4C), as well as reducing PPAR α expression in these cells. Indeed, recent research by Noriega et al. [40] has shown that ChREBP does repress SIRT1 expression. Conversely, liver-specific knock-out of SIRT1 increases ChREBP, promoting steatosis [41]. Thus, fructose could impair PPAR α expression and activity by activating ChREBP, which could be responsible for the direct increase in the expression of lipogenic genes,

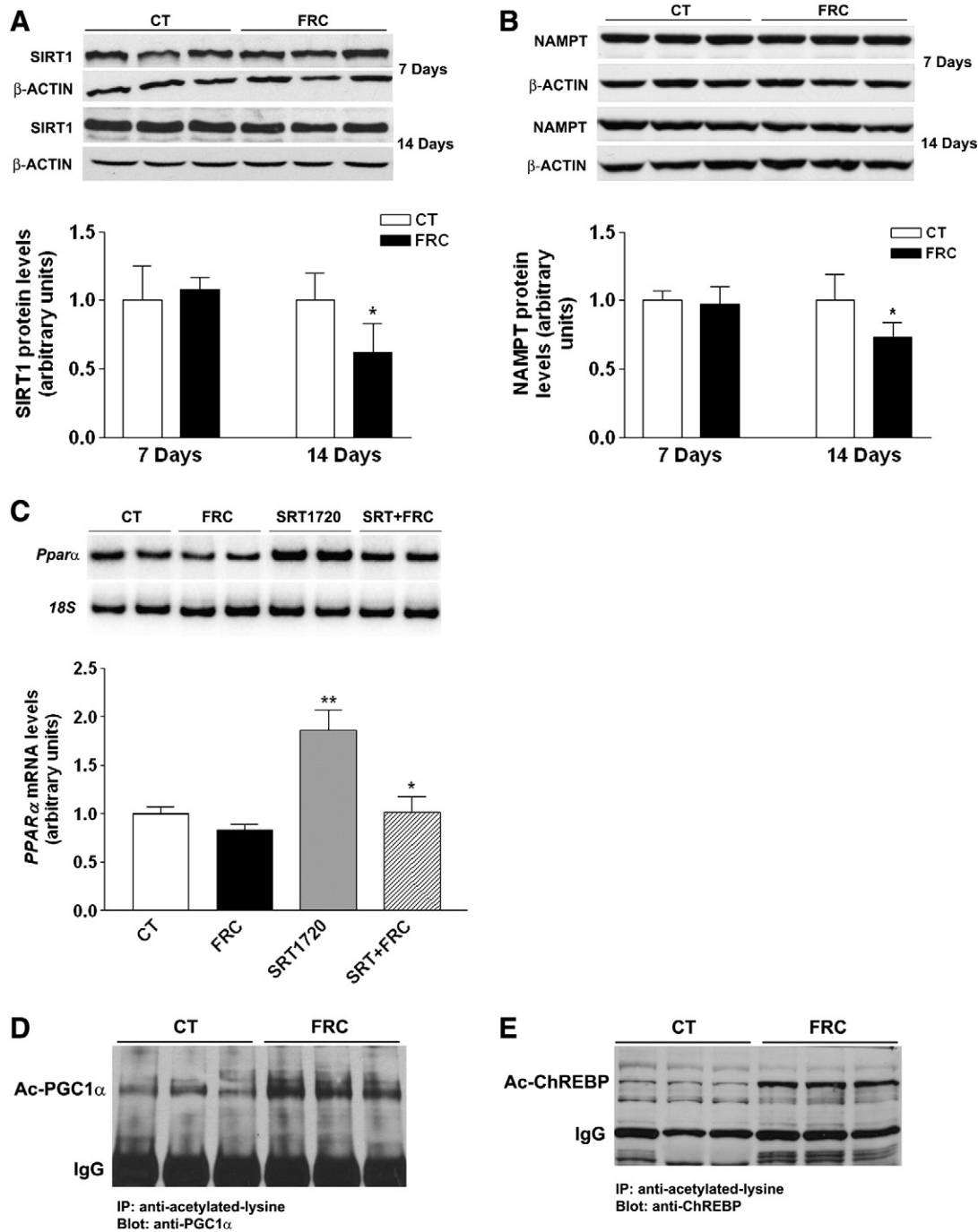


Fig. 6. Fructose reduces liver SIRT1 expression and increases the amount of acetylated proteins: SIRT1 (A) and NAMPT (B) proteins in the livers of control and fructose-supplemented female rats. Each bar represents the mean \pm sd of values obtained from $n = 4$ and $n = 5$ animals (for control and fructose groups, respectively). Above the figure, a representative Western blot shows the SIRT1 and NAMPT bands corresponding to 3 different control and fructose-fed rats (C) mRNA of PPAR α in control FaO cells (CT) or in cells treated with fructose (FRC), SRT1720, or fructose plus SRT1720. Each bar represents the mean \pm sd of three different assays performed in duplicate. Acetylated PGC1 α (D) and ChREBP (E) proteins in liver samples from control and 14-day fructose-supplemented rats.

as well as, indirectly by repressing SIRT1, for the reduction of fatty acid oxidation in liver. Although there is no data suggesting ChREBP as a SIRT1 substrate, we also found an increased amount of acetylated-ChREBP protein in livers of 14-day fructose-supplemented rats (Fig. 6E). Sustained consumption of fructose could generate a feed-forward cycle, as the transcriptional activity of acetylated ChREBP is higher, at least in lipogenic target-genes, than that of the deacetylated form [42]. A diagram of the proposed involvement of SIRT1 as a key molecule in the production of fructose-related effects on lipid synthesis and fatty acid oxidation is shown in Fig. 7.

The fructose-mediated reduction in liver PPAR α expression and activity is reproduced in human hepatocytes, probably by a SIRT1-related mechanism, suggesting that a similar reduction in hepatic fatty acid oxidation could be present in humans consuming fructose-sweetened beverages. In fact, a fructose-rich diet reduces liver fatty acid oxidation in healthy male subjects [43]. Patients suffering from metabolic alterations (metabolic syndrome, T2DM) are frequently treated with fibrate-type hypolipidemic drugs, whose pharmacological properties are due to PPAR α activation [28]. Our results suggest that consumption of fructose-sweetened beverages by this population

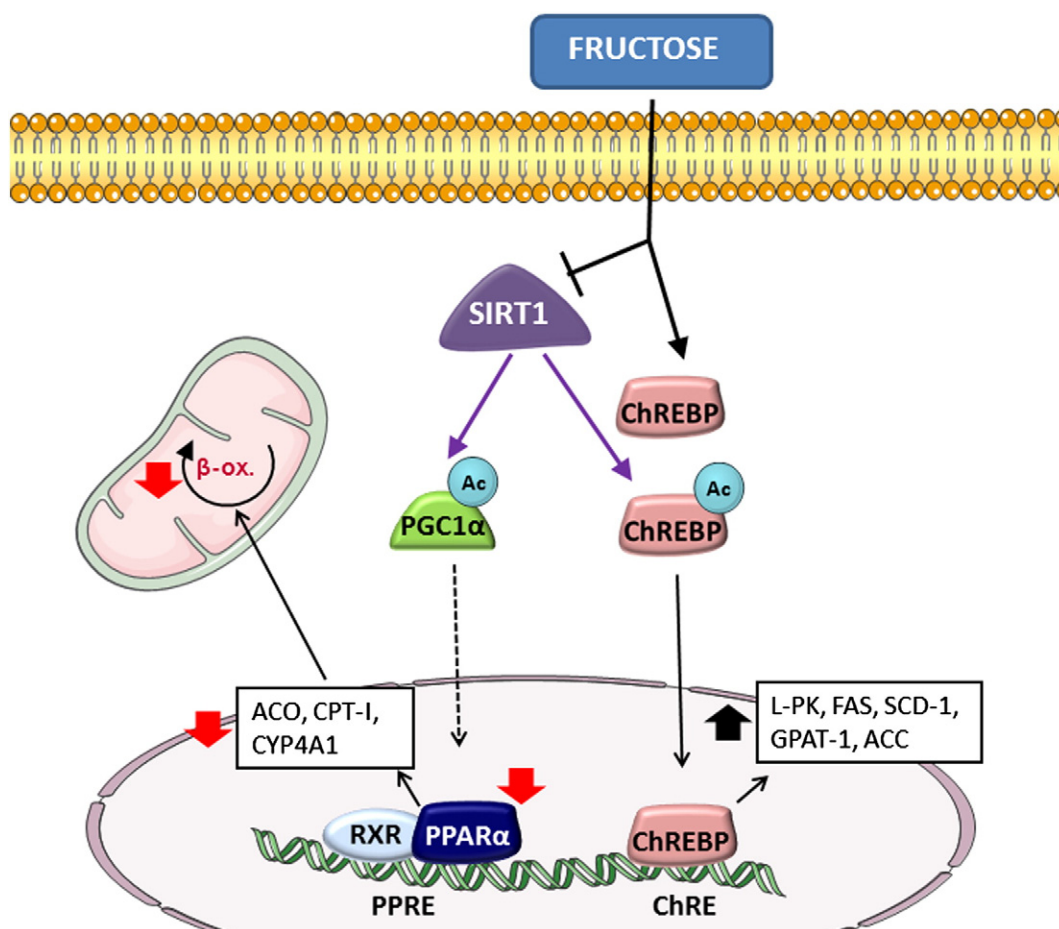


Fig. 7. Fructose increases liver lipid synthesis by directly activating ChREBP and indirectly by inhibiting SIRT1, thus promoting the accumulation of active, acetylated-ChREBP. Further, inhibition of SIRT1 also promotes the accumulation of inactive, acetylated-PGC1 α , reducing the expression and activity of PPAR α and its target genes controlling liver fatty acid oxidation.

could reduce the efficacy of drug-therapy, worsening their metabolic control.

In conclusion, fructose depresses PPAR α expression and activity in hepatic tissue from 14-days fructose-supplemented rats, and in rat and in human liver cells, by a mechanism that could involve a concerted increase in ChREBP and a reduction of SIRT1 expression and activity. The possible role of ChREBP activation, as the key molecular switch for the production of the two main effects of fructose in liver, increased lipid synthesis and decreased fatty acid oxidation, deserves further studies.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2014.01.002>.

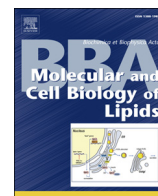
Acknowledgements

This study was supported by grants from the Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, SAF2010-15664 and the European Commission FEDER funds. Alba Rebollo was supported by a predoctoral grant from FIS/ISCIII. Miguel Baena was supported by an FPI-MICINN grant from Spanish Ministry of Science and Innovation. We are a Consolidated Research Group of the Autonomous Government of Catalonia (SGR09-00413). We would like to thank the University of Barcelona's Language Advisory Service for revising the manuscript.

References

- [1] F.B. Hu, V.S. Malik, Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence, *Physiol. Behav.* 100 (2010) 47–54.
- [2] E. Fabbrini, S. Sullivan, S. Klein, Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications, *Hepatology* 51 (2010) 679–689.
- [3] D. Preiss, N. Sattar, Lipids, lipid modifying agents and cardiovascular risk: a review of the evidence, *Clin. Endocrinol.* 70 (2009) 815–828.
- [4] M.A. Pereira, The possible role of sugar-sweetened beverages in obesity etiology: a review of the evidence, *Int. J. Obes.* 30 (2006) S28–S36.
- [5] V.S. Malik, B.M. Popkin, G.A. Bray, J.-P. Després, F.B. Hu, Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk, *Circulation* 121 (2010) 1356–1364.
- [6] M.K. Hellerstein, Carbohydrate-induced hypertriglyceridemia: modifying factors and implications for cardiovascular risk, *Curr. Opin. Lipidol.* 13 (2002) 33–40.
- [7] J.S. Lim, M. Mietus-Snyder, A. Valente, J.-M. Schwartz, R.H. Lustig, The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7 (2010) 251–264.
- [8] G.N. Prager, J.A. Ontko, Direct effects of fructose metabolism on fatty acid oxidation in a recombined rat liver mitochondria-high speed supernatant system, *Biochim. Biophys. Acta* 424 (1976) 386–395.
- [9] N. Roglans, L. Vilà, M. Alegret, R.M. Sánchez, M. Vázquez-Carrera, J.C. Laguna, Impairment of hepatic STAT-3 activation and reduction of PPAR α activity in fructose-fed rats, *Hepatology* 45 (2007) 778–788.
- [10] L. Vila, N. Roglans, M. Alegret, R.M. Sánchez, M. Vázquez-Carrera, J.C. Laguna, Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism, *Hepatology* 48 (2008) 1506–1516.
- [11] K. Ravnskjaer, M. Boergesen, L.T. Dalgaard, S. Mandrup, Glucose-induced repression of PPAR α gene expression in pancreatic beta-cells involves PP2A activation and AMPK inactivation, *J. Mol. Endocrinol.* 36 (2006) 289–299.
- [12] S. Lavu, O. Boss, P.J. Elliott, P.D. Lambert, Sirtuins — novel therapeutic targets to treat age-associated diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 841–853.
- [13] J.T. Rodgers, C. Lerin, Z. Gerhart-Hines, P. Puigserver, Metabolic adaptations through the PGC-1 α and SIRT1 pathways, *FEBS Lett.* 582 (2008) 46–53.
- [14] J.N. Feige, M. Lagouge, C. Canto, A. Strehle, S.M. Houten, J.C. Milne, P.D. Lambert, C. Matakis, P.J. Elliott, J. Auwerx, Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation, *Cell Metab.* 8 (2008) 347–358.
- [15] M. Helenius, M. Hänninen, S.K. Lehtinen, A. Salminen, Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF κ B transcription factor in mouse cardiac muscle, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28 (1996) 487–498.

- [16] M.M. Bradford, A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* (1976) 248–254.
- [17] N. Roglans, E. Sanguino, C. Peris, M. Alegret, M. Vázquez, T. Adzet, C. Díaz, G. Hernandez, J.C. Laguna, R.M. Sánchez, Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor α expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2002) 232–239.
- [18] P.B. Lazarow, Assay of peroxisomal β -oxidation of fatty acids, *Methods Enzymol.* 72 (1981) 315–319.
- [19] A. Planavila, J.C. Laguna, M. Vázquez-Carrera, Nuclear factor kappa B activation leads to down regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 17464–17471.
- [20] L. Vila, N. Roglans, V. Perna, R.M. Sánchez, M. Vázquez-Carrera, M. Alegret, J.C. Laguna, Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose, *J. Nutr. Biochem.* 22 (2011) 741–751.
- [21] K. Uyeda, J.J. Repa, Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis, *Cell Metab.* 4 (2006) 107–110.
- [22] S.Y. Kim, H.I. Kim, T.H. Kim, S.S. Im, S.K. Park, I.K. Lee, K.S. Kim, Y.H. Ahn, SREBP-1c mediates the insulin dependent hepatic glucokinase expression, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 30823–30829.
- [23] T. Leone, C.J. Weinheimer, D.P. Kelly, A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in the cellular fasting response: the PPAR α -null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 7473–7478.
- [24] S.-H. Koo, H. Satoh, S. Herzig, C.-H. Lee, S. Hedrick, R. Kulkarni, R.M. Evans, J. Olefsky, M. Montminy, PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR- α dependent induction of TRB-3, *Nat. Med.* 10 (2004) 530–534.
- [25] M. Yoon, The role of PPAR α in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPAR α actions, *Pharmacol. Res.* 60 (2009) 151–159.
- [26] M. Schreurs, F. Kuipers, F.R. van der Leij, Regulatory enzymes of mitochondrial β -oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome, *Obes. Rev.* 11 (2010) 380–388.
- [27] V. Pashkov, J. Huang, V.K. Parameswara, W. Kedzierski, D.M. Kurrasch, G.G. Tall, V. Esser, R.D. Gerard, K. Uyeda, H.C. Towle, T.M. Wilkie, Regulator of G protein signaling (RGS16) inhibits hepatic fatty acid oxidation in a carbohydrate response element-binding protein (ChREBP)-dependent manner, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 15116–15125.
- [28] M. Hamblin, L. Chang, Y. Fan, J. Zhang, Y.E. Chen, PPARs and the cardiovascular system, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 1415–1452.
- [29] R.T. Boudreau, D.W. Hoskin, The use of okadaic acid to elucidate the intracellular role(s) of protein phosphatase 2A: lessons from the mast cell model system, *Int. Immunopharmacol.* 5 (2005) 1507–1518.
- [30] J.-F. Louet, G. Hayhurst, F.J. Gonzalez, J. Girard, J.-F. Decaux, The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 α and cAMP-response element-binding protein (CREB), *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 37991–38000.
- [31] H. Wang, C.B. Wollheim, Does chasing selected “Fox” to the nucleus prevent diabetes? *Trends Mol. Med.* 11 (2005) 262–265.
- [32] J.C. Milne, P.D. Lambert, S. Schenk, D.P. Carney, J.J. Smith, D.J. Gagne, L. Jin, O. Boss, R.B. Perni, C.B. Vu, J.E. Bemis, R. Xie, J.S. Disch, P.Y. Ng, J.J. Nunes, A.V. Lynch, H. Yang, H. Galonek, K. Israelian, W. Choy, A. Iffland, S. Lavu, O. Medvedik, D.A. Sinclair, J.M. Olefsky, M.R. Jirousek, P.J. Elliott, C.H. Westphal, Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes, *Nature* 450 (2007) 712–716.
- [33] X. Hou, S. Xu, K.A. Maitland-Toolan, K. Sato, B. Jiang, Y. Ido, F. Lan, K. Walsh, M. Wierzbicki, T.J. Verberuren, R.A. Cohen, M. Zang, SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 20015–20026.
- [34] C. Cantó, Z. Gerhart-Hines, J.N. Feige, M. Lagouge, L. Noriega, J.C. Milne, P.J. Elliott, P. Puigserver, J. Auwerx, AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity, *Nature* 458 (2009) 1056–1060.
- [35] B.N. Finck, D.P. Kelly, Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease, *Circulation* 115 (2007) 2540–2548.
- [36] A. Purushotham, T.T. Schug, Q. Xu, S. Surapreddi, X. Guo, X. Li, Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation, *Cell Metab.* 9 (2009) 327–338.
- [37] N. Daly-Youcef, M. Lagouge, S. Froelich, C. Koehl, K. Schoojans, J. Auwerx, Sirtuins: the “magnificent seven”, function, metabolism and longevity, *Ann. Med.* 39 (2007) 335–345.
- [38] R. Dentin, L. Tomas-Cobos, F. Foufelle, J. Leopold, J. Girard, C. Postic, P. Ferre, Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver, *J. Hepatol.* 56 (2012) 199–209.
- [39] M. Boergesen, L. la Cour Poulsen, S. Fisker Schmidt, F. Frigerio, P. Maechler, S. Mandrup, ChREBP mediated glucose repression of peroxisome proliferator-activated receptor α expression in pancreatic β -cells, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 13214–13225.
- [40] L.G. Noriega, J.N. Feige, C. Cantó, H. Yamamoto, J. Yu, M.A. Herman, C. Matak, B.B. Kahn, J. Auwerx, CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability, *EMBO Rep.* 12 (2011) 1069–1076.
- [41] R.H. Wang, C. Li, C.X. Deng, Liver steatosis and increased ChREBP expression in mice carrying a liver specific SIRT1 null mutation under a normal feeding condition, *Int. J. Biol. Sci.* 6 (2010) 682–690.
- [42] J. Bricambert, J. Miranda, F. Benhamed, J. Girard, C. Postic, R. Dentin, Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 4316–4331.
- [43] A. Abde-Sayed, C. Binnert, K.A. Le, M. Bortolotti, P. Schneiter, A. Tappy, A high-fructose diet impairs basal and stress-mediated lipid metabolism in healthy male subjects, *Br. J. Nutr.* 100 (2008) 393–399.



Fructose supplementation impairs rat liver autophagy through mTORC activation without inducing endoplasmic reticulum stress



Miguel Baena^a, Gemma Sangüesa^a, Natalia Hutter^a, Rosa M. Sánchez^{a,b,c}, Núria Roglans^{a,b,c}, Juan C. Laguna^{a,b,c}, Marta Alegret^{a,b,c,*}

^a Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy, University of Barcelona, Spain

^b IBUB Institute of Biomedicine, University of Barcelona, Spain

^c CIBERObn Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 July 2014

Received in revised form 14 October 2014

Accepted 4 November 2014

Available online 9 November 2014

Keywords:

Fructose

Hepatic steatosis

Autophagy

mTORC

ABSTRACT

Supplementation with 10% liquid fructose to female rats for 2 weeks caused hepatic steatosis through increased lipogenesis and reduced peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) α activity and fatty acid catabolism, together with increased expression of the spliced form of X-binding protein-1 (Rebollo et al., 2014). In the present study, we show that some of these effects are preserved after sub-chronic (8 weeks) fructose supplementation, specifically increased hepatic expression of lipid synthesis-related genes (stearoyl-CoA desaturase, $\times 6.7$ -fold; acetyl-CoA carboxylase, $\times 1.6$ -fold; glycerol-3-phosphate acyltransferase, $\times 1.65$ -fold), and reduced fatty acid β -oxidation ($\times 0.77$ -fold), resulting in increased liver triglyceride content ($\times 1.69$ -fold) and hepatic steatosis. However, hepatic expression of PPAR α and its target genes was not modified and, further, livers of 8-week fructose-supplemented rats showed no sign of unfolded protein response activation, except for an increase in p-IRE1 levels. Hepatic mTOR phosphorylation was enhanced ($\times 1.74$ -fold), causing an increase in the phosphorylation of UNC-51-like kinase 1 (ULK-1) ($\times 2.8$ -fold), leading to a decrease in the ratio of LC3B-II/LC3B-I protein expression ($\times 0.39$ -fold) and an increase in the amount of the autophagic substrate p62, indicative of decreased autophagy activity. A harmful cycle may be established in the liver of 8-week fructose-supplemented rats where lipid accumulation may cause defective autophagy, and reduced autophagy may result in decreased free fatty acid formation from triglyceride depots, thus reducing the substrates for β -oxidation and further increasing hepatic steatosis. In summary, the length of supplementation is a key factor in the metabolic disturbances induced by fructose: in short-term studies, PPAR α inhibition and ER stress induction are critical events, whereas after sub-chronic supplementation, mTOR activation and autophagy inhibition are crucial.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: ACC, acetyl-CoA carboxylase; AMPK, AMP-activated protein kinase; ATF-6, activating transcription factor-6; CHOP, C/EBP homologous protein; Dnajb9, Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9; 4E-BP1, eIF4E-binding protein; EDEM1, ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1; ER, endoplasmic reticulum; FAS, fatty acid synthase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GK, glucokinase; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; GRP, glucose regulated protein; GSK3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; HNF4, hepatic nuclear factor 4; IRE1, inositol-requiring enzyme 1; JNK, c-Jun-NH2-terminal kinase; LAMP-1, lysosome-associated membrane glycoprotein-1; LC3B, autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B; L-CPT-I, liver carnitinepalmitoyl-CoA transferase I; LDH, lactate dehydrogenase; L-PK, liver-pyruvate kinase; mTOR(C), mammalian target of rapamycin (complex); NAMPT, nicotinamide phosphoribosyltransferase; p38 MAPK, protein 38 mitogen activated protein kinase; PERK, protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase; PGC-1 α , peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 α ; PPAR α , peroxisome proliferator activated receptor α ; Rheb, Ras homolog enriched in brain; SCD1, stearoyl-CoA desaturase 1; SIRT1, sirtuin 1; sXBP-1, X-box binding protein 1, spliced form; SREBP, sterol response element binding protein; Tel2, telomere maintenance 2; Tsc2, tuberous sclerosis complex 2; ULK-1, UNC-51-like kinase 1

* Corresponding author at: Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, School of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII 27–31, Barcelona 08028, Spain. Tel.: +34 93 402 4531x28; fax: +34 93 403 5982.

E-mail address: alegret@ub.edu (M. Alegret).

1. Introduction

Fructose is a natural sugar contained in fruits and honey which is used as an added sugar to sweeten foods and beverages during processing or preparation. Global changes in dietary habits have led to an increase in added sugar consumption in recent decades [1], which has been linked to increased trends in obesity, dyslipidemia, fatty liver and type 2 diabetes [2–5]. Specifically, fructose rather than glucose has been reported to be responsible for the metabolic disturbances observed, such as obesity or liver fat deposition [6]. Recently, it has been shown that feeding mice a high fructose diet causes hepatic steatosis due to increased de novo lipogenesis linked to endoplasmic reticulum (ER) stress [7,8].

Rats are used more frequently than mice as models to investigate the mechanisms by which fructose causes metabolic alterations. The rat is a good model for the study of fructose metabolism because unlike other animal species but similar to humans, it does not transform ingested fructose into glucose due to a lack of intestinal glucose-6 phosphatase

[9]. Our laboratory has researched several issues regarding the molecular effects of fructose on liver fat and glucose metabolism after short-term consumption (7 or 14 days) of a 10% w/v fructose solution [10–16]. These studies have demonstrated that fructose supplementation to female Sprague–Dawley rats for 14 days significantly changes the activity and expression of key nutrient-sensing molecules in the liver, such as the mammalian target of rapamycin (mTOR) [15], a protein kinase which signals in at least two distinct multiprotein complexes (mTORC). Specifically, we observed that fructose supplementation stimulated Ser-2481 mTOR phosphorylation, which is considered a marker of mTOR activity [17]. However, it is still unknown whether the observed mechanisms are also activated after longer periods of fructose supplementation, which would better mimic the usual pattern of fructose consumption in the human population. Therefore, in the present study we supplemented female Sprague–Dawley rats with a 10% w/v fructose solution for 8 weeks, a sub-chronic regime which roughly corresponds to a 6-year period of daily fructose consumption in humans [18]. Our results show that some of the metabolic disturbances observed in earlier short-term studies, such as hepatic steatosis, increased fatty acid synthesis and inhibition of oxidation, are still observed after 8 weeks, whereas PPAR α inhibition is absent. In addition, although there are no signs of hepatic ER stress, our results show decreased autophagy which may be linked to mTOR activation in the liver.

2. Material and methods

2.1. Animals and experimental design

Female Sprague–Dawley rats (Charles River, Barcelona, Spain) were maintained with water and food ad libitum at constant humidity and temperature, with a light/dark cycle of 12 h, and were randomly assigned to a control group and a fructose-supplemented group (8 and 12 rats per group, respectively). Female rats were used because they are more sensitive to the deleterious effects of fructose on glucose homeostasis than male rats [13]. Fructose was supplied as a 10% (w/v) solution in drinking water for 8 weeks. Food and liquid intakes were measured daily per 2 rats housed in a cage. The amount of food consumed was measured by subtracting the weight of the remaining pellets from the initial weight of pellets provided. Liquid intake was calculated as the difference between the remaining volume of liquid in the bottle and the initial volume provided (both measured with a graduated cylinder). After 8 weeks, food and fructose were removed at 8 a.m. and the animals were sacrificed by decapitation under isoflurane anesthesia at 10 a.m. To reduce variability in plasma estrogen concentrations, female rats were sacrificed during the diestrus period.

Blood and liver tissue samples were collected and stored as described elsewhere [11]. All procedures were conducted in accordance with the guidelines established by the University of Barcelona's Bioethics Committee (Autonomous Government of Catalonia Act 5/1995, July 21).

2.2. Sample preparations

Total and nuclear extracts from rat liver were isolated by the Helenius method [19]. Protein concentrations were determined by the Bradford method [20].

2.3. Lipid and lipoprotein analysis

Plasma triglycerides were measured using an Accutrend® Plus System glucometer (Roche Farma, Barcelona, Spain). Plasma cholesterol was determined by Cholesterol CHOD-POD colorimetric test (Spinreact, Girona, Spain).

Size fractionation of plasma lipoproteins was performed by fast performance liquid chromatography (FPLC) of pooled filtered plasma

samples as previously described [21], and total cholesterol and triglyceride content in each fraction was then assayed.

Liver triglycerides were extracted and measured as described by Roglans et al. [10].

2.4. Enzyme activity assays

Hepatic fatty acid β -oxidation activity was determined in rat livers as in [22], with 30 μ g of postnuclear supernatant.

2.5. RNA preparation and analysis

Total RNA was isolated by using the Trizol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. Specific mRNAs were assessed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using SYBR green PCR Master Mix, specific primers and the Applied Biosystems One-Step Plus sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As internal control, TATA box binding protein (tbp) was used. Primer sequences and PCR product length are listed in Supplementary Table 1.

2.6. Western blot analysis

30 μ g of different protein fractions from rat livers was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis [8,9]. Proteins were then transferred to Immobilon polyvinylidene difluoride transfer membranes (Millipore, Billerica, MA, USA), blocked for 1 h at room temperature with 5% non-fat milk solution in 0.1% Tween-20-Tris-buffered saline (TBS), and incubated as described previously [11]. Detection was performed using the ECL chemiluminescence kit for HRP (Amersham GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona, Spain). To confirm the uniformity of protein loading, blots were incubated with β -tubulin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as a control. Primary antibodies for phospho- and total ACC, AMPK GSK3 β and 4E-BP1 were supplied by Cell Signaling (Danvers, MA, USA), those for PPAR α and p62 were obtained from AbCam (Cambridge, UK), and the antibody against phospho-mTOR was purchased from Millipore (Billerica, MA, USA). The rest of the antibodies used were from Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, TX, USA).

2.7. Co-immunoprecipitation

250 μ g of protein extracts was incubated with 4 μ g of anti-acetylated-lysine, Rheb and mTOR antibodies (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) in a final volume of 0.5 mL with buffer containing 10 mM PBS and 2% BSA for 4 h at 4 °C. Immunocomplexes were captured by incubating the samples with protein A/G PLUS-Agarose suspension (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), overnight at 4 °C on a rocker platform. Agarose beads were collected by centrifugation and washed three times with lysis buffer (RIPA buffer containing protease inhibitors). After microcentrifugation, the pellet was resuspended with 40 μ l of SDS-PAGE sample buffer and boiled for 5 min to elute the samples. The supernatant was subjected to electrophoresis in 10% SDS-PAGE (or 7% for mTOR detection) and immunoblotted with an antibody against GAPDH, mTOR (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Rag C (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) and Tel2 (ProteinTech, Manchester, UK). To avoid interference of signal detection by the immunoglobulin heavy and light chains, Rabbit IgG TrueBlot Antibody Peroxidase Conjugate (eBioscience) was used.

2.8. Histological studies

Lipid accumulation was analyzed in the liver sections stained with Oil Red O. Images were acquired with an Olympus BX71 microscope equipped with a DP72 camera and analyzed by a registered pathologist at BioBanc (Banc de tumors-IDIBAPS, Barcelona, Spain), who was

Table 1

Effects of 10% w/v fructose supplementation for 8 weeks on liquid and food ingestion, zometric parameters and plasma and liver lipid levels.

	Control (n = 5)	Fructose (n = 8)
AUC ingested liquid (ml/days/2 rats)	3044 ± 412	14422 ± 1320***
AUC consumed diet (g/days/2 rats)	1779 ± 17	1041 ± 39***
AUC body weight (g/days/rat)	12873 ± 477	14107 ± 685**
Final body weight (g)	265 ± 10	289 ± 20*
Adipose tissue weight (g)	6.02 ± 1.01	11.20 ± 3.32**
% adipose tissue weight	2.3 ± 0.4	3.8 ± 0.9**
Liver weight (g)	7.46 ± 0.40	9.52 ± 1.17**
% liver weight	2.8 ± 0.1	3.3 ± 0.2**
Hepatic triglycerides (mg/g liver)	4.9 ± 1.2	6.2 ± 1.9
Plasma triglycerides (mg/dl)	86 ± 8	145 ± 10***
Plasma cholesterol (mg/dl)	160 ± 3	164 ± 8

% referred to total body weight.

* p < 0.05.

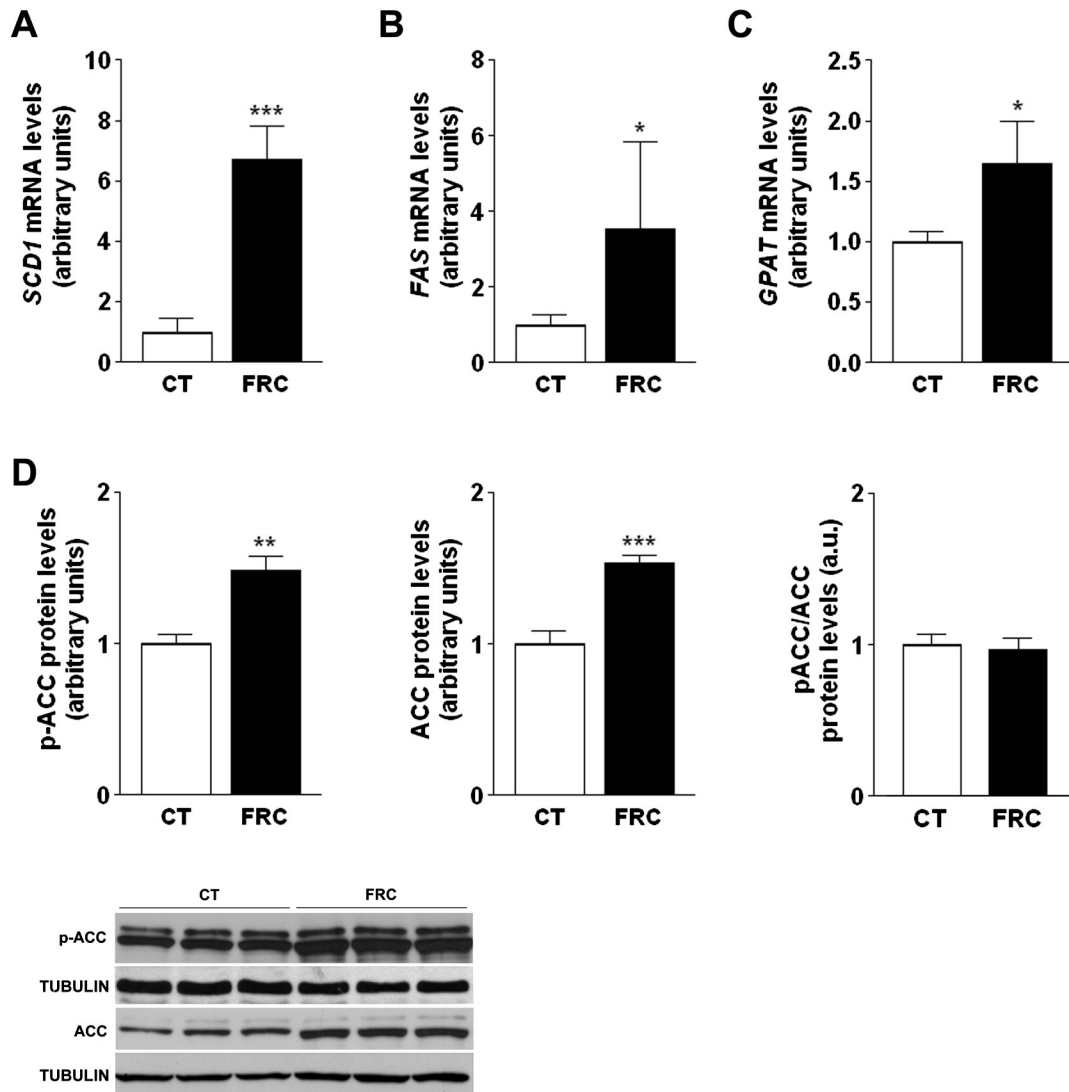
** p < 0.01.

*** p < 0.001.

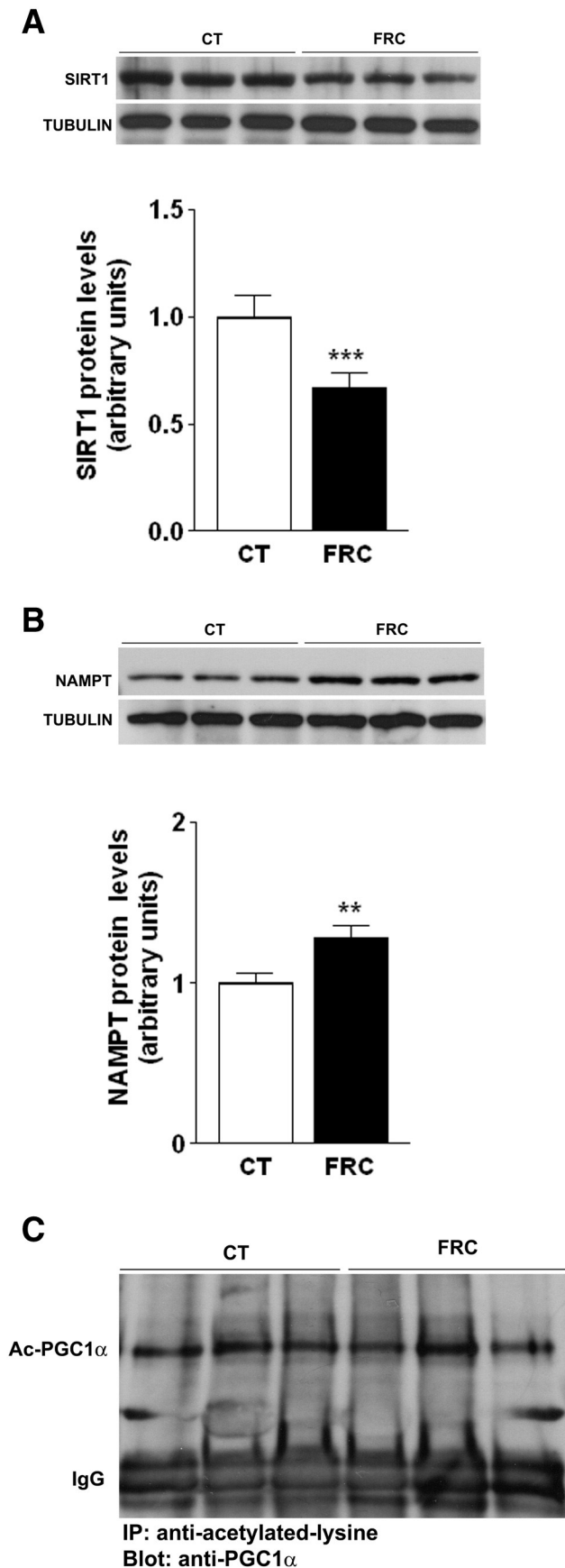
Table 2Effect of 10% liquid fructose supplementation for 8 weeks on hepatic fatty acid β -oxidation activity and expression of related genes and kinases.

β -oxidation activity	Control (n = 5)	Fructose (n = 8)
nmol/min/mg protein	0.49 ± 0.10	0.36 ± 0.07*
Gene	Control (n = 5)	Fructose (n = 8)
<i>PPARα</i>	1.00 ± 0.04	0.92 ± 0.11
<i>HNF4</i>	1.00 ± 0.10	0.78 ± 0.90*
<i>L-cpt-1</i>	1.00 ± 0.06	1.15 ± 0.33
Protein	Control (n = 4)	Fructose (n = 5)
<i>PPARα</i>	1.00 ± 0.11	1.22 ± 0.10*
<i>HNF4</i>	1.00 ± 0.10	0.97 ± 0.05
p-AMPK	1.00 ± 0.12	0.85 ± 0.10
AMPK	1.00 ± 0.04	0.97 ± 0.04
p-Akt	1.00 ± 0.10	0.98 ± 0.07
Akt	1.00 ± 0.09	1.02 ± 0.14
p-ERK	1.00 ± 0.27	0.92 ± 0.14
ERK	1.00 ± 0.17	0.90 ± 0.05
p-GSK3 β	1.00 ± 0.16	0.92 ± 0.07
GSK3 β	1.00 ± 0.09	0.97 ± 0.06

* p < 0.05.

**Fig. 1.** Fructose effects on markers of hepatic fatty acid and triglyceride synthesis. mRNA levels of SCD-1 (A), FAS (B) and GPAT (C) expressed as mean \pm sd from 5 control and 8 fructose-supplemented rats. (D) Western-blot of phospho- and total ACC proteins in liver samples from control and fructose-supplemented rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown (n. s., non-specific band). Bar plots show the levels of each protein and the ratio between the phosphorylated and the total ACC protein expressed as the mean (arbitrary units) \pm sd of the values obtained in samples from 4 control and 5 fructose-supplemented rats. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

unaware of the treatment groups. The area of positive staining for Oil Red O was calculated as a percentage of stained cells/total section area in each sample.



2.9. Statistics

The results are expressed as the mean of n values \pm standard deviation. Plasma samples were assayed in duplicate. Significant differences were established by the unpaired t -test (GraphPad Software V2.03). When the number of samples was too small or variance was not homogeneous, a non-parametric test was performed. The level of statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Fructose supplementation for 8 weeks causes hypertriglyceridemia and increases body weight

Rats supplemented with 10% liquid fructose for 8 weeks drank more ($\times 4.7$ -fold) and reduced the ingestion of solid food ($\times 0.58$ -fold) compared with control rats (Table 1). However, this reduction was not sufficient to compensate for the calories obtained from fructose, which represented 63% of the total calories consumed. Thus, total caloric intake was 1.6-fold higher in fructose-supplemented than in control rats, and this resulted in a slight but significant increase in body weight throughout the treatment period and at the end of it ($\times 1.09$ -fold) (Table 1). Liver and adipose tissue weights were also higher in fructose-supplemented rats either in absolute terms ($\times 1.28$ -fold and $\times 1.86$ -fold, respectively) or in percentage related to total body weight ($\times 1.17$ -fold and $\times 1.69$ -fold, respectively). Fructose-supplemented rats displayed hypertriglyceridemia ($\times 1.69$ -fold), with no changes in plasma cholesterol levels (Table 1). FPLC analysis demonstrated that the increase in triglycerides after fructose treatment occurred exclusively in the VLDL fraction (Supplemental Fig. 1).

3.2. Fructose increases hepatic fatty acid synthesis and inhibits fatty acid β -oxidation independently of PPAR α and SIRT1 activity

The hepatic mRNA expression of key genes related to fatty acid synthesis, such as stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and fatty acid synthase (FAS), was increased after fructose supplementation (Fig. 1A, B). In addition, hepatic mRNA expression of mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), the enzyme that catalyzes the first step in triacylglycerol synthesis, was increased by 1.65-fold in the livers of fructose-supplemented rats (Fig. 1C). On the other hand, the protein expression of acetyl-CoA carboxylase (ACC) was also increased by fructose supplementation, with no modification of the degree of ACC activation determined as the ratio of phosphorylated versus total protein (Fig. 1D). Confirming our previous data [11–13,16], the expression of the mature form of SREBP-1c was not modified by fructose supplementation (data not shown).

Our previous results in female rats supplemented with liquid fructose for 14 days [16] showed that hepatic fatty acid β -oxidation was inhibited through reduced peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) expression and activity, related to a decrease in the expression and activity of the deacetylase sirtuin-1 (SIRT1). Our present data show that hepatic fatty acid β -oxidation activity was significantly reduced by 0.77-fold, but despite small changes in the hepatic expression of PPAR α and hepatic nuclear factor 4 (HNF4), a transcription factor which controls β -oxidation activity, the expression of the PPAR α target gene liver carnitine palmitoyl transferase I (L-CPT-I) was not reduced after 8 weeks of fructose supplementation (Table 2). Moreover, although we continued to observe a reduction in SIRT1 expression

Fig. 2. Fructose reduces liver SIRT1 expression but not PGC1 α acetylation. Western-blot of SIRT1 (A) and NAMPT (B) proteins in the livers of control and fructose-supplemented rats. Bar plots show the levels of each protein, expressed as the mean (arbitrary units) \pm sd of the values obtained in samples from 4 control and 5 fructose-supplemented rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown. (C) Acetylated PGC1 α proteins in representative samples from three control and three fructose-supplemented rats. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

($\times 0.67$ -fold, Fig. 2A) in livers of 8-week fructose-supplemented rats, the expression of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), an enzyme essential for the synthesis of NAD^+ and SIRT1 activity, was increased by 1.28-fold (Fig. 2B). This suggests that there was no deficit in SIRT1 activity, corroborated by the fact that the degree of acetylation of the SIRT-1 substrate PPAR γ coactivator 1 α (PGC1 α) was not affected by fructose supplementation (Fig. 2C). Furthermore, the amount of the phosphorylated, active form of adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK), a metabolic sensor that controls SIRT1 activity [23], was unchanged in the livers from fructose-fed rats (Table 2).

3.3. Fructose supplementation activates mTOR and promotes the transcription of genes in the glycolytic and pentose phosphate pathways

Our results show that there was a significant 1.57-fold increase in mTOR Ser-2481 phosphorylation (Fig. 3A) in the livers of rats supplemented with fructose for 8 weeks. Accordingly, there was a significant increase in the phosphorylation of its downstream effector 4E-BP1 at

Thr37/46, confirming the activation of mTORC1 (Fig. 3B). In our previous study on rats supplemented with liquid fructose for 14 days, we also found an increase in phosphorylated mTOR, which was attributed to an increase in the activity of protein 38-mitogen activated protein kinase (p38-MAPK) [15]. It has been described that p38-MAPK, by phosphorylating the tuberous sclerosis complex 2 (Tsc2), could release its inhibitory activity on mTORC1 [24]. However, despite a marked increase in phosphorylated Tsc2 (Fig. 3C) in the livers of 8-week fructose-supplemented rats, the activity of p38-MAPK remained unchanged (Fig. 3D), as did that of other kinases that may also be involved in Tsc2 phosphorylation (Table 2).

It has been shown that the activation of mTOR stimulates glycolysis and the pentose phosphate pathway through increased transcription of key genes involved in these metabolic routes [25]. Accordingly, fructose supplementation induced hepatic mRNA expression of the glycolytic enzymes liver-pyruvate kinase (L-PK), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and lactate dehydrogenase (LDH), as well as glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), a key enzyme of the

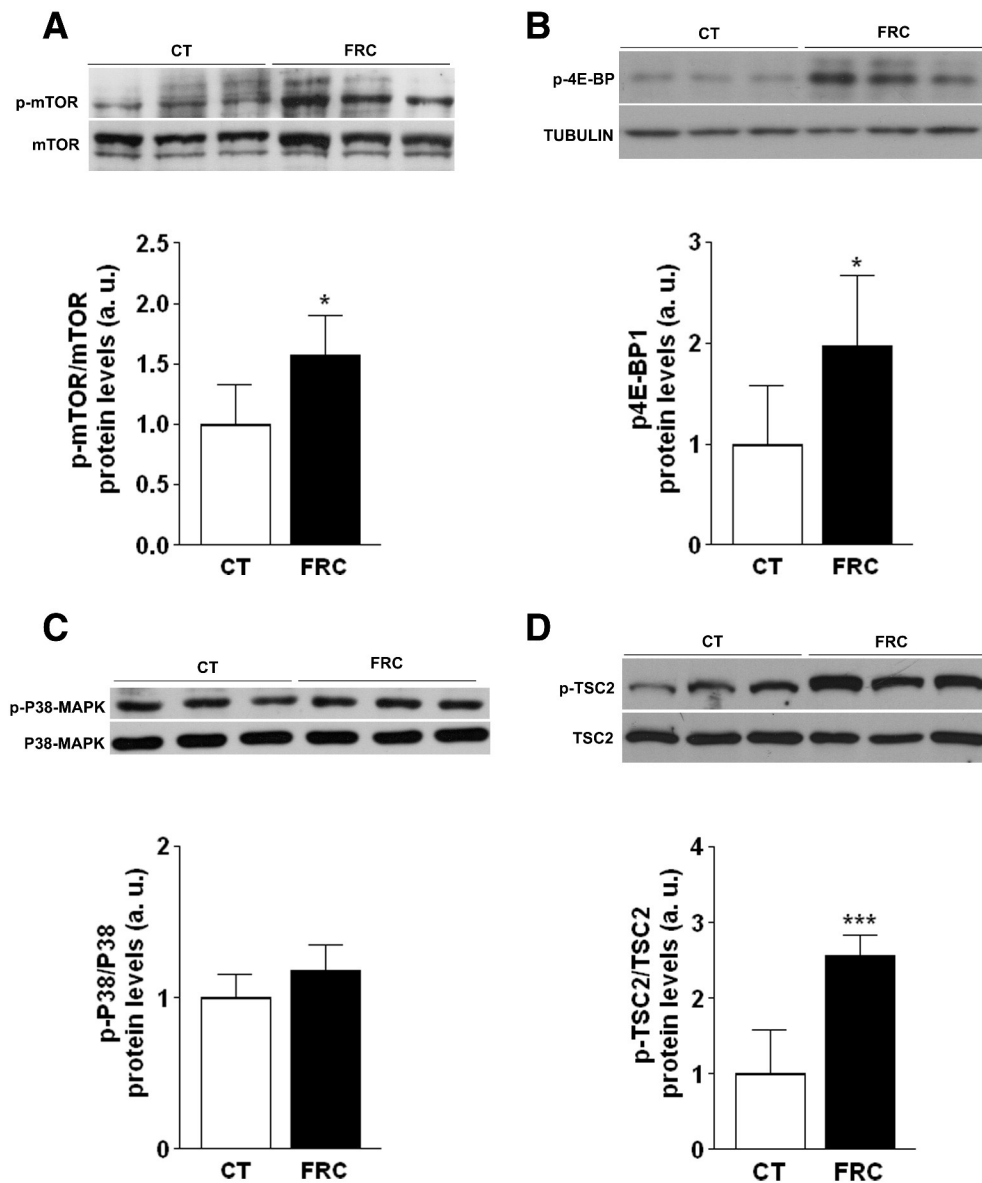


Fig. 3. Supplementation with fructose increases hepatic TSC2 and mTOR phosphorylation independently from p38-MAPK. Western-blot of phospho- and total mTOR (A), phosphorylated 4E-BP1 (B) and phospho- and total p38-MAPK (C) and TSC2 (D) proteins in the livers of control and fructose-supplemented rats. Bar plots show the expression of phosphorylated proteins versus the total or versus tubulin, expressed as the mean (a. u., arbitrary units) \pm sd of the values obtained in samples from 4 control and 5 fructose-supplemented rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

oxidative arm of the pentose phosphate pathway (Fig. 4A). Increased glycolysis seems to be specifically driven by fructose, as fructokinase expression was induced ($\times 1.88$ fold) while glucokinase was not (Fig. 4B, C).

mTOR phosphorylation on Ser 2481, and thus mTORC activation, is also promoted by Ras homolog enriched in brain (Rheb) overexpression [26]. In liver samples from fructose-supplemented rats, we only observed a slight increase in Rheb protein levels (Supplemental Fig. 2A). It has been reported that under conditions of high glycolytic flux, there is an increase in Rheb availability to interact with and activate mTORC1, caused by the suppression of the interaction between GAPDH and Rheb [26]. To determine whether the increase in glycolysis found in the liver of fructose-supplemented rats could affect the interaction of Rheb with mTORC1, we performed co-immunoprecipitation experiments, which showed that neither Rheb-GAPDH nor Rheb-mTOR interactions were affected by fructose treatment. Further, Rag GTPases (RagC), which signal not only amino-acid but also glucose concentrations to mTORC1 [27], were neither involved (Supplemental Fig. 2B).

On the other hand, the assembly of mTORC components, and thus activation of the complexes, is regulated by the TTT multiprotein complex (Tel2, Tti1 and Tti2) through direct interaction with mTOR [28]. This mechanism does not seem to be involved in mTORC activation by fructose supplementation, as we did not observe any change in the

amount of Tel2 protein or in the interaction between Tel2 and mTOR in co-immunoprecipitation assays (Supplemental Fig. 2B).

3.4. Fructose-driven hepatic steatosis does not induce ER stress in rats, while autophagy is inhibited

We were interested in determining the effect of fructose supplementation on endoplasmic reticulum (ER) stress response, as it has been shown to be induced in mice and rats with increased de novo lipogenesis after being fed a high fructose diet [7,8,29]. In our previous studies on 14-day fructose-supplemented female rats, we had observed higher levels of phosphorylated inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) and an increase in the spliced form of X-box binding protein 1 (sXBP-1) mRNA and nuclear protein, involved in the ER stress response [15]. However, in the livers of 8-week fructose-supplemented rats, although there was still an increase in p-IRE1 levels (Fig. 5A), indicative of activation, the protein levels of sXBP-1 were not increased (Fig. 5B). Neither did we observe activation of the stress kinase c-Jun-NH2-terminal kinase (JNK), which is a IRE1 downstream effector [30] (Fig. 5A). The other branches of the ER stress response, protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and activating transcription factor-6

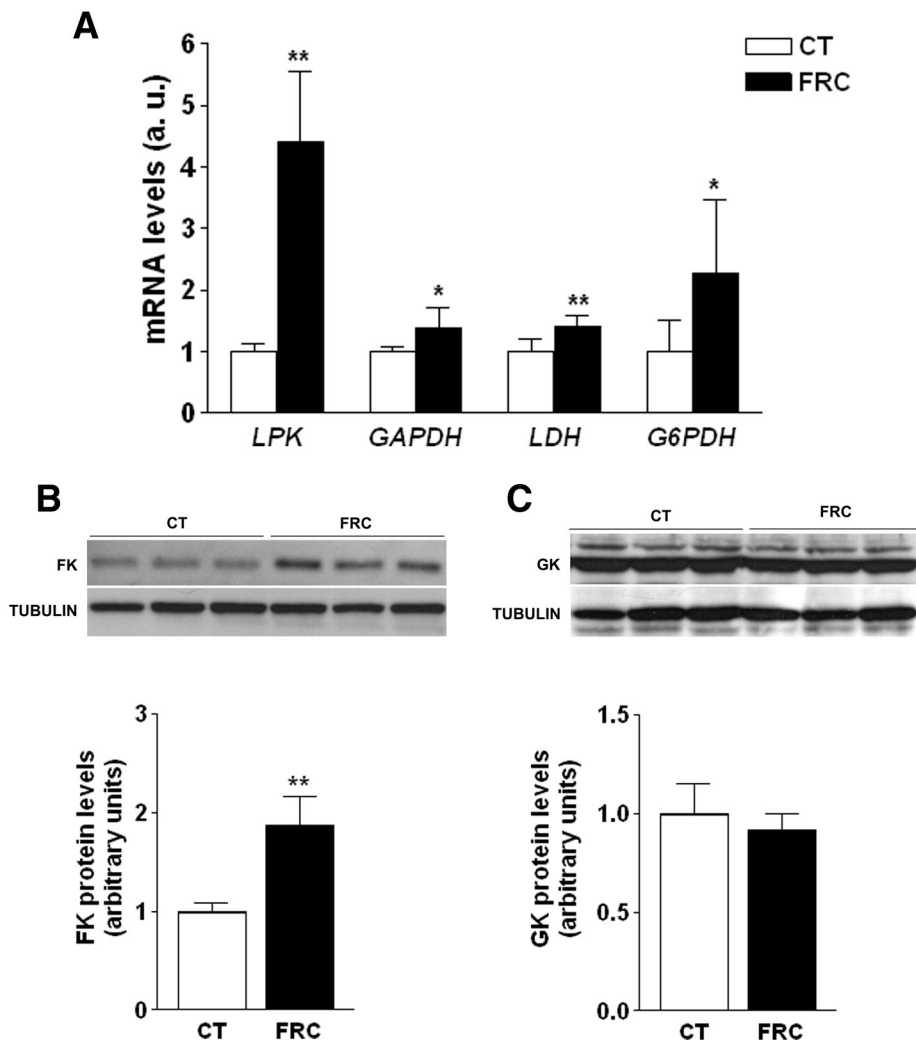


Fig. 4. Fructose increases the transcription of genes involved in glycolysis and pentose phosphate pathways in the liver. (A) mRNA levels of L-PK, GAPDH, LDH and G6PDH in hepatic samples from control and fructose-supplemented rats. Each bar represents the mean (arbitrary units) \pm sd of the values obtained from 5 control and 8 fructose-supplemented animals. Western-blot of FK (B) and GK (C) proteins in the livers of control and fructose-supplemented rats. Bar plots show the levels of each protein, expressed as the mean (arbitrary units) \pm sd of the values obtained in the samples from 4 control and 5 fructose-supplemented rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

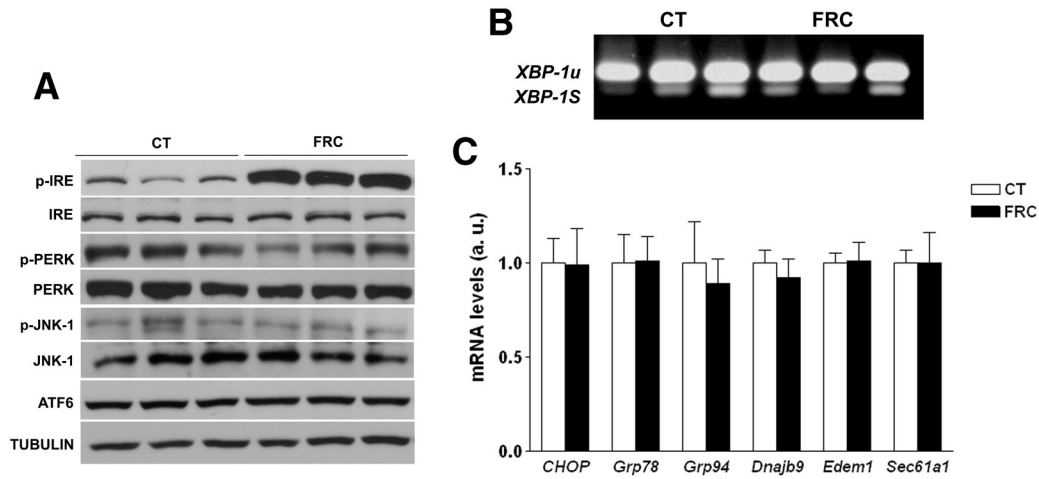


Fig. 5. Fructose supplementation for 8 weeks increases hepatic p-IRE1, but not markers of ER stress response. (A) Western-blot of p- and total IRE, p- and total PERK, ATF6 α , and p- and total JNK proteins in the livers of control and fructose-supplemented rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown. (B) Autoradiograph of an agarose gel showing bands corresponding to unspliced (u) and spliced (s) XBP-1 mRNA in liver samples corresponding to three control and three fructose-supplemented rats. (C) mRNA levels of ER stress markers CHOP, Grp78, Grp94, Dnajb9, Edem1 and Sec61a1 in hepatic samples from control and fructose-supplemented rats. Each bar represents the mean (arbitrary units) \pm sd of the values obtained from 5 control and 8 fructose-supplemented animals.

(ATF-6) and mRNA levels of several ER stress markers were also unaffected by fructose feeding (Fig. 5A, C).

Increased synthesis and reduced catabolism of fatty acids in the livers of fructose-supplemented rats resulted in hepatic steatosis as assessed by biochemical and histological analysis (Table 1 and Fig. 6). Hepatic lipid accumulation has been related to reduced autophagy [31]. Therefore, we were interested in studying autophagy activity in hepatic samples from control and fructose-supplemented rats. Our results show that the ratio of LC3B-II/LC3B-I protein expression, indicative of autophagic activity, was decreased by 60% in the livers of fructose-supplemented rats (Fig. 7A). mTORC1 has emerged as one of the repressors of autophagy, through phosphorylation of Ser 757 on UNC-51-like kinase 1 (ULK-1) [32]. In accordance with our results showing an increase in the phosphorylated active form of mTOR in hepatic samples from rats supplemented with fructose for 8 weeks, the amount of P-Ser⁷⁵⁷-ULK-1 was also increased by 2.8-fold (Fig. 7B). Moreover, the level of the autophagy target p62 was significantly higher in hepatic samples from fructose-supplemented rats (Fig. 7C). On the other hand, levels of the lysosomal marker lysosome-associated membrane glycoprotein-1 (LAMP-1) were not significantly modified (Fig. 7D).

4. Discussion

In a previous report, we demonstrated that fructose supplementation (10% w/v in liquid form) to female Sprague–Dawley rats for 14 days induced hepatic fatty acid synthesis and reduced β -oxidation [16]. Our present results show that a longer supplementation period (8 weeks) causes similar effects in fatty acid metabolism, but whereas

in short-term supplementation studies the mechanisms involved in these metabolic alterations depend on PPAR α inhibition, the effects of sub-chronic supplementation are instead related to defective hepatic autophagy. Moreover, with this longer supplementation protocol, we did not observe any signs of ER stress in the liver.

Previous reports by Ren et al. [7] showed that feeding a high fructose diet to mice caused an increase in hepatic de novo lipogenesis, which was related to the induction of ER stress. In contrast, despite presenting a similar degree of hepatic steatosis, mice fed a high fat diet showed no increase in ER stress markers, which was attributed to the fact that lipogenesis was not increased, but decreased. In the present study, although fructose supplementation increased de novo lipogenesis in rat liver (Fig. 1), most markers of ER stress were unaltered: we only detected an increase in p-IRE1 levels, but neither in the downstream effectors of this branch nor in the two other branches (PERK and ATF6) of the unfolded protein response (Fig. 5). The differences with the study by Ren et al. may be attributed to the animal model used, as fructose metabolism clearly differs in rats and mice. For example, mice are able to convert ingested fructose into glucose, whereas rats, like humans, cannot perform this conversion [9]. Therefore, as a surrogate model for humans, the rat is a better model than the mouse to study fructose metabolism.

The amount of fructose supplemented to the rodents does not seem to significantly account for the differences in ER stress response. Thus, in a study performed by Su et al. [29], rats received a similar amount of calories from fructose as in our present study (around 60%), but contrary to our results, they did observe an increase in ER stress markers. Length of treatment may be a more critical factor, as in our previous study we

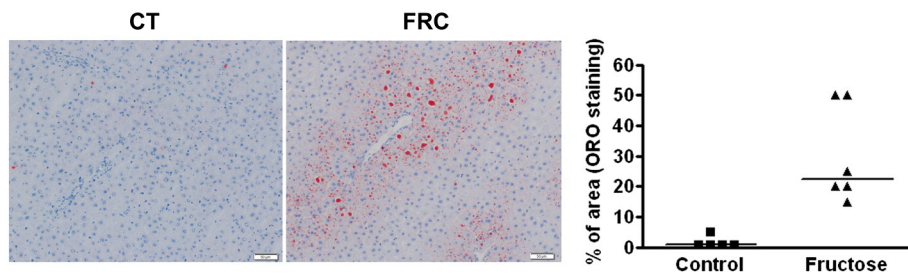


Fig. 6. Hepatic steatosis in 8 week-fructose-supplemented rats. Histological study of liver sections from control rats and rats supplemented with 10% fructose. Livers were cryosectioned and processed for histological examination of fat infiltration by Oil Red O staining. Images are representative of liver sections from control (n = 5) and fructose-supplemented (n = 6) rats. The scatter plot shows individual values of the stained area calculated as a percentage of stained cells/total section area. The horizontal line across each group locates the median.

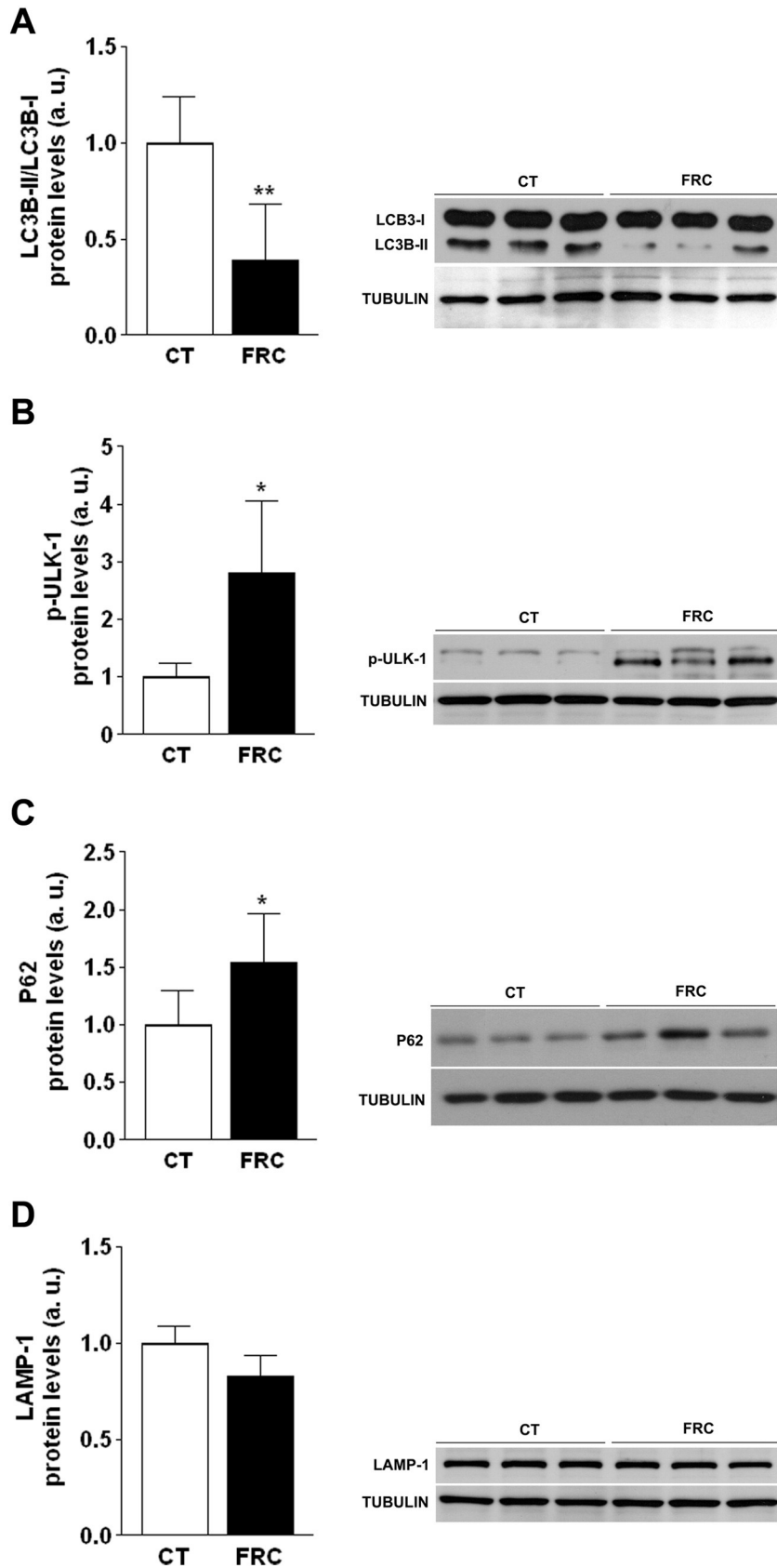


Fig. 7. Fructose inhibits autophagy in the liver through increased ULK-1 phosphorylation. (A) Protein levels of LC3B-I and LC3B-II in liver samples from control and fructose-supplemented rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown. Bar plot shows the ratio between LC3B-II and LC3B-I, expressed as the mean (a. u., arbitrary units) \pm sd of the values obtained in samples from 4 control and 5 fructose-supplemented rats. Western blot of phosphorylated ULK-1 (B), p62 (C) and LAMP1 (D) proteins in samples from the livers of control and fructose-supplemented rats. Bar plots show the levels of each protein, expressed as the mean (a. u., arbitrary units) \pm sd of the values obtained in samples from 4 control and 5 fructose-supplemented rats. For each protein, representative bands corresponding to three different rats in each treatment group are shown. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

observed not only IRE1 activation, but also a marked increase in the spliced form of XBP-1 mRNA and nuclear protein, suggesting hepatic ER stress in rats supplemented with fructose for 2 weeks [15]. These results, together with the decrease in PPAR α observed in 2-week supplemented rats, are closer to those obtained by Su et al. using a fructose supplementation period of 3 weeks [29].

Despite the lack of ER stress, our results show defective autophagy in the livers of fructose-supplemented rats. To the best of our knowledge, this is the first report showing that fructose consumption reduces liver autophagy. Although a previous report [33] showed a putative increase in autophagy markers after fructose feeding in rats, the experimental design used, including intra-uterine growth restriction, switching of litters between dams and prolonged solid fructose administration to the offspring, makes it very difficult to compare with our present results. Autophagy (also termed macroautophagy) is a homeostatic process that is triggered by several environmental cues (such as starvation or excess of nutrients), and it has recently been shown to be involved in pathological conditions, including metabolic disorders [34]. More precisely, autophagy is inhibited in response to high glucose levels through mTORC1 activation [35]. Our results show that in the livers of rats supplemented with fructose there is a marked increase in the phosphorylation of mTOR and of its downstream substrate 4E-BP1 (Fig. 3A, B). This effect can be attributed to increased phosphorylation of Tsc2 in Thr-1462 (Fig. 3C), as phosphorylation of this site suppresses the inhibitory effect of Tsc1/2 on mTORC1 [36]. The exact mechanism by which Tsc2 is phosphorylated remains to be established, as none of the kinases that we examined (p38-MAPK, Akt, ERK, AMPK and GSK3 β) were activated in the livers of fructose-supplemented rats (Fig. 3D, Table 2).

Independently of the upstream mechanism involved, our results show that fructose supplementation induces mTOR phosphorylation in Ser-2481, which is an autophosphorylation position considered a biomarker for intrinsic mTORC specific catalytic activity [17]. Moreover, mTOR autophosphorylation is increased together with increased transcription of genes involved in glycolysis and pentose phosphate pathways (Fig. 4A), also indicative of mTORC1 activation [17,25]. Thus, the activation of mTORC1 is probably the reason for the observed increase in the phosphorylation of ULK-1 in the livers of fructose-supplemented rats, which results in autophagy inhibition as is also shown by the reduction in the autophagic marker LC3B-II (Fig. 7A).

Defective autophagy in obese or high fat diet-fed rodents may be caused by the inhibition of autophagosome formation or through lysosomal defects/impaired fusion of lysosomes and autophagosomes [36]. Our results point to the first mechanism, as ULK1 is an important regulator of the formation of the phagophore, a pre-autophagosomal structure, and therefore ULK1 inactivation inhibits the initial phases of the autophagic pathway [33]. Moreover, we also observed reduced levels of LC3B-II, the lipidated form of LC3B-I, which is involved in a later phase (closing of the membrane to form a vesicular autophagosome) [33]. Although low levels of LC3B-II could reflect a more rapid turnover, the fact that ULK1 activity is inhibited points to a general defect in autophagy caused by fructose supplementation. Moreover, although we could not directly measure autophagic function by determining changes in LC3-II in the presence or absence of lysosomal inhibitors, we observed an increase in the levels of the autophagy substrate p62, which indicates impairment in autophagic flux [37]. In contrast, LAMP-1 levels were not significantly reduced in hepatic samples from fructose-supplemented rats, suggesting that the fusion of autophagosomes with lysosomes is not affected.

Recently, it has been found that lipids accumulated in hepatocytes as lipid droplets can be selectively degraded through autophagy, a process termed lipophagy [31]. Genetic or pharmacological inhibition of autophagy, either *in vivo* or *in vitro*, promotes triglyceride accumulation in the hepatocyte [31], while the promotion of autophagy using drugs such as rapamycin, an inhibitor of mTORC1, reduces hepatic steatosis in mice with alcoholic and non-alcoholic fatty liver [38]. Regulation is two-way, as intracellular lipid accumulation inhibits autophagy in

mice fed a high fat diet resulting in obesity and fatty liver [31,39]. In the present study, rats supplemented with fructose showed a marked increase in adiposity (Table 1) and a significant accumulation of lipids in the liver (Table 1 and Fig. 6) which could account, at least in part, for defective autophagy. Thus, we could hypothesize that a harmful cycle may be established in the livers of fructose-supplemented rats where intracellular lipid accumulation inhibits autophagy, and as a consequence lipophagy would be reduced, further increasing hepatic triglyceride and lipid droplet content. Moreover, the inhibition of fatty acid β -oxidation activity observed in fructose-supplemented rats (Table 2) may also in part be related to defective lipophagy, as it results in decreased free fatty acid formation from triglycerides stored in lipid droplets, and consequently in a deficit of substrates for fatty acid β -oxidation [40]. In addition, increased expression of GPAT, an enzyme which competes with L-CPT-1 for acyl-CoAs [24], may also further reduce substrate availability for β -oxidation. Lastly, the inhibition of hepatic β -oxidation could also be related to the allosteric inhibition of the rate-limiting enzyme L-CPT-1 by malonyl-CoA, due to increased ACC expression [16] (Fig. 1D).

In summary, the length of supplementation is a key factor in the metabolic disturbances induced by fructose. Thus, some of the effects that are critical in short-term studies, such as PPAR α inhibition or ER stress induction, are not observed after longer supplementation periods, possibly as an adaptive response of the organism to the continuous supply of the carbohydrate. However, some of the early effects still persist, notably mTOR activation. Moreover, we describe here for the first time that sub-chronic fructose supplementation, more similar to the human consumption pattern, inhibits hepatic autophagy, which could explain both β -oxidation inhibition and lipid liver deposition, without increasing ER stress in this organ.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2014.11.003>.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Fundació Privada Catalana de Nutrició i Lípids, SAF2010-15664, SAF2013-42982-R and the European Commission FEDER funds. Miguel Baena and Gemma Sangüesa were supported by FPI and FPU grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation. We are a Consolidated Research Group of the Autonomous Government of Catalonia (SGR09-00413; SGR13-00066). We would like to thank J.C. Escolà-Gil for the analysis of lipid content in lipoprotein fractions. We also thank the University of Barcelona' Language Advisory Service for revising the manuscript.

References

- [1] K. Park, A. Yetley, Intakes and food sources of fructose in the United States, *Am. J. Clin. Nutr.* 58 (1993) 737S–747S.
- [2] L.R. Vartanian, M.B. Schwartz, K.D. Brownell, Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis, *Am. J. Public Health* 97 (2007) 667–675.
- [3] J.A. Welsh, A. Sharma, J.L. Abramson, C. Gillespie, M.B. Vos, Caloric sweetener consumption and dyslipidemia among US adults, *JAMA* 303 (2010) 1490–1497.
- [4] L.S. Gross, L. Li, E.S. Ford, S. Liu, Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 774–779.
- [5] M. Maersk, A. Belza, H. Stødkilde-jørgensen, S. Ringgaard, E. Chabanova, H. Thomsen, et al., Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: a 6-month randomized intervention study, *Am. J. Clin. Nutr.* 95 (2012) 283–289.
- [6] M.I. Goran, K. Dumke, S.G. Bouret, B. Kayser, R.W. Walker, B. Blumberg, The obesogenic effect of high fructose exposure during early development, *Nat. Rev. Endocrinol.* 9 (2013) 494–500.
- [7] L.-P. Ren, S.M.H. Chan, X.-Y. Zeng, D.R. Laybutt, T.J. Iseli, R.-Q. Sun, et al., Differing endoplasmic reticulum stress response to excess lipogenesis versus lipid oversupply in relation to hepatic steatosis and insulin resistance, *PLoS One* 7 (2012) e30816.
- [8] S.M.H. Chan, R.-Q. Sun, X.-Y. Zeng, Z.-H. Choong, H. Wang, M.J. Watt, et al., Activation of PPAR α ameliorates hepatic insulin resistance and steatosis in high fructose-fed mice despite increased endoplasmic reticulum stress, *Diabetes* 62 (2013) 2095–2105.

- [9] P.A. Mayes, Intermediary metabolism of fructose, *Am. J. Clin. Nutr.* 58 (1993) 754S–765S.
- [10] N. Roglans, E. Sanguino, C. Peris, M. Alegret, M. Vázquez, T. Adzet, et al., Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302 (2002) 232–239.
- [11] N. Roglans, L. Vilà, M. Farré, M. Alegret, R.M. Sánchez, M. Vázquez-Carrera, et al., Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats, *Hepatology* 45 (2007) 778–788.
- [12] L. Vilà, N. Roglans, M. Alegret, R.M. Sánchez, M. Vázquez-Carrera, J.C. Laguna, Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism, *Hepatology* 48 (2008) 1506–1516.
- [13] L. Vilà, N. Roglans, V. Perna, R.M. Sánchez, M. Vázquez-Carrera, M. Alegret, et al., Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose, *J. Nutr. Biochem.* 22 (2011) 741–751.
- [14] L. Vilà, A. Rebollo, G.S. Adalsteisson, M. Alegret, M. Merlos, N. Roglans, et al., Reduction of liver fructokinase expression and improved hepatic inflammation and metabolism in liquid fructose-fed rats after atorvastatin treatment, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 251 (2011) 32–40.
- [15] A. Rebollo, N. Roglans, M. Baena, A. Padrosa, R.M. Sánchez, M. Merlos, et al., Liquid fructose down-regulates liver insulin receptor substrate 2 and gluconeogenic enzymes by modifying nutrient sensing factors in rats, *J. Nutr. Biochem.* 25 (2014) 250–258, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.014>.
- [16] A. Rebollo, N. Roglans, M. Baena, R.M. Sánchez, M. Merlos, M. Alegret, et al., Liquid fructose downregulates Sirt1 expression and activity and impairs the oxidation of fatty acids in rat and human liver cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1841 (2014) 514–524.
- [17] G. a Soliman, H. a Acosta-Jaquez, E. a Dunlop, B. Ekim, N.E. Maj, A.R. Tee, et al., mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 7866–7879.
- [18] P. Sengupta, The laboratory rat: relating age with human's, *Int. J. Prev. Med.* 4 (2013) 624–630.
- [19] M. Helenius, M. Hänninen, S.K. Lehtinen, a Salminen, Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF-kB transcription factor in mouse cardiac muscle, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28 (1996) 487–498.
- [20] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [21] J.C. Escolà-Gil, J. Julve, a Marzal-Casacuberta, J. Ordóñez-Llanos, F. González-Sastre, F. Blanco-Vaca, Expression of human apolipoprotein A-II in apolipoprotein E-deficient mice induces features of familial combined hyperlipidemia, *J. Lipid Res.* 41 (2000) 1328–1338.
- [22] P.B. Lazarow, Assay of peroxisomal β -oxidation of fatty acids, *Methods Enzymol.* 72 (1981) 315–319.
- [23] C. Cantó, Z. Gerhart-Hines, J.N. Feige, M. Lagouge, L. Noriega, J.C. Milne, et al., AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity, *Nature* 458 (2009) 1056–1060.
- [24] Y. Li, K. Inoki, P. Vacratsis, K.-L. Guan, The p38 and MK2 kinase cascade phosphorylates tuberlin, the tuberous sclerosis 2 gene product, and enhances its interaction with 14-3-3, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 13663–13671.
- [25] K. Düvel, J.L. Yecies, S. Menon, P. Raman, A.I. Lipovsky, A.L. Souza, et al., Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1, *Mol. Cell* 39 (2010) 171–183.
- [26] M.N. Lee, S.H. Ha, J. Kim, A. Koh, C.S. Lee, J.H. Kim, et al., Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of Rheb, *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 3991–4001.
- [27] A. Efeyan, R. Zoncu, S. Chang, I. Gumper, H. Snitkin, R.L. Wolfson, et al., Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival, *Nature* 493 (2013) 679–683.
- [28] S.G. Kim, G.R. Hoffman, G. Pouligiannis, G.R. Buel, Y.J. Jang, K.W. Lee, et al., Metabolic stress controls mTORC1 lysosomal localization and dimerization by regulating the TTT-RUVBL1/2 complex, *Mol. Cell* 49 (2013) 172–185.
- [29] Q. Su, C. Baker, P. Christian, M. Naples, X. Tong, K. Zhang, et al., Hepatic mitochondrial and ER stress induced by defective PPAR α signaling in the pathogenesis of hepatic steatosis, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306 (2014) E1264–E1273.
- [30] R. Sano, J.C. Reed, *Biochimica et Biophysica Acta* ER stress-induced cell death mechanisms, *BBA Mol. Cell Res.* 1833 (2013) 3460–3470.
- [31] R. Singh, S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, et al., Autophagy regulates lipid metabolism, *Nature* 458 (2009) 1131–1135.
- [32] R.C. Russell, H.-X. Yuan, K.-L. Guan, Autophagy regulation by nutrient signaling, *Cell Res.* 24 (2014) 42–57.
- [33] M. Aijälä, E. Malo, O. Ukkola, R. Bloigu, P. Lehenkari, H. Autio-Harmainen, et al., Long-term fructose feeding changes the expression of leptin receptors and autophagy genes in the adipose tissue and liver of male rats: a possible link to elevated triglycerides, *Genes Nutr.* 8 (2013) 623–635.
- [34] A.M.K. Choi, S.W. Ryter, B. Levine, Autophagy in human health and disease, *N. Engl. J. Med.* 368 (2013) 651–662.
- [35] J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, K.-L. Guan, AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1, *Nat. Cell Biol.* 13 (2011) 132–141.
- [36] M. Shimobayashi, M.N. Hall, Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 155–162.
- [37] D.J. Klionsky, F.C. Abdalla, H. Abeliovich, R.T. Abraham, A. Acevedo-Arozena, K. Adeli, et al., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy, *Autophagy* 8 (2012) 445–544.
- [38] C.-W. Lin, H. Zhang, M. Li, X. Xiong, X. Chen, X. Chen, et al., Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice, *J. Hepatol.* 58 (2013) 993–999.
- [39] L. Yang, P. Li, S. Fu, E.S. Calay, G.S. Hotamisligil, Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance, *Cell Metab.* 11 (2010) 467–478.
- [40] K. Liu, M.J. Czaja, Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy, *Cell Death Differ.* 20 (2013) 3–11.

