



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Efecto de nicotinamida sobre enzimas productoras de NADPH durante la lipogénesis de novo inducida en rata

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

OSIRIS ALEJANDRO MARTÍNEZ MAR

ASESORAS

DRA. MARGARITA DÍAZ FLORES

M. EN C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efecto de nicotinamida sobre enzimas productoras de NADPH durante la lipogénesis de novo inducida en rata.

Que presenta el pasante: Osiris Alejandro Martínez Mar

Con número de cuenta: 413048549 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Mayo de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
1er. SUPLENTE	Q. Arcadia Hernández Beltrán	
2do. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/Imcf*cga

DEDICATORIA

Principalmente para mi familia querida y también para aquellas personas que tienen un lugar muy importante en mi corazón y memoria.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, Gran Maestro que me abrió el camino para estar en donde estoy ahora, por darme la entereza para mantenerme firme y que sé que nunca me dejará solo.

A mi tía Elia, quien ha tenido un papel muy importante en mi vida, no solo como tía sino como una madre, por ser mi soporte en los buenos y malos momentos, mi confidente, por su gran fuerza y amor a la vida, por creer en mí siempre, por alentarme a mirar hacia arriba y alcanzar nuevos objetivos.

A mi padre Francisco, por estar ahí para mí, por sus enseñanzas y visión de la vida, por la paciencia que me ha tenido desde siempre, su gran cariño, por inculcarme el amor al conocimiento y a ver más allá de lo evidente.

A mi madre Mireya, de quien he aprendido a enfrentar con fuerza las adversidades, a defender mis ideales, a quien le tengo una profunda admiración por su capacidad para afrontar los peores momentos.

A mis padres por darme mis dos hermanas hermosas Diana y Suri, a quienes amo mucho y les deseo un buen porvenir.

A mi tía Dalia, por acompañarme en los inicios de mi vida y por todos sus cuidados.

A mi familia en general, por qué no me han dejado solo ni un momento y por el gran cariño que me han mostrado.

A la doctora Margarita Díaz, por abrirme las puertas del peine 2, por ser una gran maestra en el tiempo que he estado allí, por sus atenciones con todos sus alumnos y a quien debo decirle que es una excelente persona.

A la profesora Ana Laura, por invitarme al Centro Médico Nacional S. XXI, por ser también una gran maestra, por ayudarme académicamente, y de quien admiro el gran gusto que tiene por ayudar a los demás.

A Saraí y María del Carmen, que me recibieron cálidamente tan pronto como nos conocimos, por los buenos momentos, quienes me han enseñado mucho en todo

este tiempo, por sus consejos, gran ayuda en tiempos apremiantes y que sin ellas parte de ésta tesis hubiera sido mucho más difícil de realizar.

A Mariana, que llegaste mucho después, pero que hemos tenido muy divertidos momentos y también he aprendido mucho de ti.

A mis compañeros del laboratorio: maestra Martha, David, Julio, Sergio, Rubén. Raúl, Miguel, Leticia y Miriam; que hicieron muy ameno el tiempo en la unidad de investigación.

A los compañeros del Hospital Infantil de México: doctora Alejandra, doctora Lupita, Lucy, Lupita, David, Dalia, Héctor, Ricardo y Damián; que los conocí casi al terminar éste trabajo, pero que hicieron muy agradable mi estancia en el hospital.

A mis amigas de la carrera: Mimí, Liliana, Marian, Sara, Isabel, Cecilia y Andrea; por acompañarme en el trayecto de la universidad, con quienes tuve grandes momentos, por permitirme conocerlas y por las excelentes personas que han sido conmigo. Muchas gracias por su amistad.

A Mishell, primera amiga que tuve en éste lugar totalmente desconocido para mí, por acompañarme también durante estos 5 años, por su ayuda, por los tiempos de diversión, por escucharme y aconsejarme.

A Víctor, por qué eres muy importante para mí, por tu ayuda, por tu paciencia, por qué de ti he aprendido lo que no había aprendido de nadie más y por qué has sabido cambiar mis perspectivas.

A mis amigos de la preparatoria: Mizraim, Carolina y Frances Cárdenas; a quienes les debo en parte el haber llegado a donde estoy. A ellos y a Diana, Mar y Sol, Edith, Pedro, Gandhi, Zahel, Jessica y Karina; con quienes he compartido increíbles momentos y a quienes les debo que mi tiempo en la preparatoria haya sido muy especial.

A Carlos Santamaría, por escuchar mis más alocados pensamientos y por tus palabras de aliento.

*A Jose Antonio y José Eleazar, por su apoyo en los momentos que lo he requerido.
Les tengo gran estima.*

*A mis amigos en general, por qué también han contribuido a ser parte de lo que soy
hoy día y de quienes tengo muy agradables recuerdos.*

A las personas que han creído en mí, por sus buenos deseos.

*A las personas que no han creído en mí, puesto que me han dado fuerza para
demostrarme que puedo salir adelante y lograr grandes cosas.*

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepúlveda, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la Dra. Margarita Díaz Flores.

Agradecimientos al Fondo de Investigación en Salud con número de registro
FIS/IMSS/PROT/G15/1424



RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la obesidad y al sobrepeso como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser nocivo para la salud. Ambos padecimientos se encuentran entre los principales problemas de salud pública en México. El peso corporal del individuo depende en gran medida del balance energético, es aquí donde la gran disponibilidad de alimentos y bebidas de gran densidad energética, asociado a un estilo de vida sedentario, son decisivos para la prevalencia del sobrepeso y la obesidad (Gil, 2015). Con ésta apreciación se ha observado un incremento en el consumo energético total en todas las razas/etnias, edades, y niveles económicos. Se estima que aproximadamente 50% del incremento de la ingesta calórica diaria proviene del consumo de bebidas edulcoradas altas en calorías, como el refresco. Por ello el consumo de bebidas edulcoradas tiene una importante contribución a la epidemia del sobrepeso y la obesidad, en virtud además de una baja saciedad y una incompleta compensación de la energía total consumida (Malik, Schulze, & Hu, 2006). Debido al alto contenido de fructosa de las bebidas edulcoradas, se han realizado diversos estudios en los cuales han observado que la fructosa, proveniente de la ingesta o de la degradación de la sacarosa estimula la producción de Tag en mayor medida que la glucosa (Bray, 2013). La NAM, la forma amida del ácido nicotínico, (Rolfe, 2014), ha sido estudiada en diferentes modelos demostrando tener un efecto regulador sobre la lipogénesis *de novo*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto regulador de NAM sobre la activación de enzimas productoras de NADPH (G6PD, IDP y ME) inducidas por la administración de una solución de fructosa al 40% con la finalidad de frenar la lipogénesis *de novo*. El modelo experimental consistió en la administración de solución de fructosa al 40% *ad libitum* durante 16 semanas. A la semana 5 de iniciada la administración del carbohidrato, se suplementó NAM diariamente por 5 horas a diferentes concentraciones (5, 10 y 15 mM) en el agua de beber. Los resultados obtenidos demuestran que la administración de fructosa induce la lipogénesis *de novo*, constatado por la ganancia de peso, AGL, Tag, Ct, LDL; así como disminución de HDL, aumento de MDA sérico y resistencia a la insulina. A nivel hepático se observó aumento de actividades y expresión de G6PD

y ME, AGH, MDA, GSSG, aumento del poder reductor, dado por NADH/NAD y NADPH/NADP y decremento de GSH. Todas las alteraciones metabólicas y tisulares inducidas por la fructolipototoxicidad fueron abatidas por NAM a las dosis empleadas. En conclusión, la NAM reduce la síntesis de ácidos grasos *de novo*, estrés oxidante y mejora la sensibilidad a la insulina a través de regular la enzima G6PD, indicando que NAM es una alternativa de tratamiento para frenar el desarrollo de la obesidad debido al excesivo consumo de fructosa.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	13
2. INTRODUCCIÓN	16
2.1. Influencia de la dieta con alto contenido energético	17
3. MARCO TEÓRICO	22
3.1. Lipogénesis <i>de novo</i>	22
3.2. Regulación de la lipogénesis <i>de novo</i>	24
3.3. Enzimas productoras de NADPH	26
3.3.1. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)	26
3.3.2. Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (IDP)	28
3.3.3. Malato deshidrogenasa descarboxilante dependiente de NADP (Enzima málica, ME)	29
3.4. Nicotinamida	30
3.5. Nucleótidos de piridina	32
3.6. Importancia de NADPH en el metabolismo celular	34
4. OBJETIVOS	36
4.1. Objetivo general	36
4.2. Objetivos particulares	36
5. HIPÓTESIS	37
6. MATERIAL Y MÉTODOS	38
6.1. Materiales	38
6.2. Modelo experimental	38
6.3. Tratamiento	39
6.4. Obtención de muestras biológicas	39
6.5. Determinación de perfil bioquímico	39
6.6. Prueba de tolerancia a la glucosa	40
6.7. Determinación de insulina y ácidos grasos libres en suero	40
6.8. Lipoperoxidación	40
6.9. Determinación de glutatión oxidado y reducido	41
6.10. Determinación de actividad específica de enzimas productoras de NADPH	41
6.10.1. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	42
6.10.2. Isocitrato deshidrogenasa	42
6.10.3. Enzima málica	42

6.11.	Extracción de RNA y PCR tiempo real para evaluar expresión de enzimas	43
6.12.	Determinación de nucleótidos de nicotinamida	44
6.13.	Análisis estadístico	44
7.	RESULTADOS	45
7.1.	Efecto de fructosa y nicotinamida sobre el volumen corporal de los animales de experimentación	45
7.2.	Efecto de fructosa y nicotinamida sobre el consumo de alimento, bebida, ingesta calórica y ganancia de peso	47
7.3.	Efecto de fructosa y nicotinamida sobre los resultados de perfil bioquímico	48
7.4.	Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la prueba de tolerancia a la glucosa	50
7.5.	Efecto de fructosa y nicotinamida sobre el grado de lipoperoxidación	51
7.6.	Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la concentración de glutatión reducido y oxidado a nivel hepático	52
7.7.	Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la expresión y actividad específica de G6PD	53
7.8.	Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la expresión y actividad específica de IDP	54
7.9.	Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la expresión y actividad específica de ME	55
7.10.	Efecto de fructosa y nicotinamida sobre NAD(H) y NADP(H).....	56
8.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	57
9.	CONCLUSIONES	65
10.	PERSPECTIVAS	66
11.	REFERENCIAS	67
12.	ANEXOS	75

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Metabolismo de la fructosa en hígado y en músculo.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 2. Panorama general de la lipogénesis de novo.</i>	<i>22</i>
<i>Figura 3. Modelo tridimensional del dímero activo de G6PD.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 4. Modelo tridimensional de la enzima IDP.</i>	<i>28</i>
<i>Figura 5. Modelo tridimensional de la enzima ME.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 6. Estructura química de ácido nicotínico y nicotinamida.</i>	<i>31</i>
<i>Figura 7. Formas oxidada y reducida de NAD(P).....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 8. Formación de NADP catalizada por NAD cinasa (NADK).....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 9. Efecto de fructosa sobre el volumen corporal de los animales de experimentación.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 10. Efecto de fructosa sobre la cantidad de grasa corporal de los animales de experimentación.</i>	<i>46</i>
<i>Figura 11 Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la prueba de tolerancia a la glucosa.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 12. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la concentración de malondialdehído, marcador de lipoperoxidación.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 13. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la concentración de GSH y GSSG a nivel hepático.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 14. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la expresión y actividad de G6PD.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 15. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la expresión y actividad de IDP.</i>	<i>54</i>
<i>Figura 16. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la expresión y actividad de ME.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 17. Curva de cuantificación para la determinación de ácidos grasos.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 18. Curva de cuantificación para la determinación de insulina sérica.</i>	<i>76</i>
<i>Figura 19. Curva de cuantificación para la determinación de glutatión..</i>	<i>77</i>
<i>Figura 20. Curva de cuantificación para la determinación de malondialdehído. ...</i>	<i>78</i>
<i>Figura 21. Curva de cuantificación para la determinación de proteína.....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 22. Curva de cuantificación para la determinación de NADPH.</i>	<i>80</i>
<i>Figura 23. Curva de cuantificación para la determinación de NADH.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 24. Resultado de la electroforesis para verificar integridad del RNA extraído.....</i>	<i>82</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla de secuencias de iniciadores.....	43
Tabla 2. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre el consumo de alimento, bebida, ingesta calórica y ganancia de peso.....	47
Tabla 3. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre los resultados de perfil bioquímico.....	49
Tabla 4. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre NAD(H) y NADP(H).....	56
Tabla 5. Tabla de concentraciones y valores de absorbancia de la curva para la cuantificación de ácidos grasos.....	75
Tabla 6. Tabla de concentraciones y valores de absorbancia de la curva para la cuantificación de insulina sérica.....	76
Tabla 7. Tabla de concentraciones y valores de absorbancia de la curva para la cuantificación de glutatión.....	77
Tabla 8. Tabla de concentraciones y valores de absorbancia de la curva para la cuantificación de MDA.....	78
Tabla 9. Tabla de concentraciones y valores de absorbancia de la curva para la cuantificación de proteínas.....	79
Tabla 10. Tabla de concentraciones y valores de absorbancia de la curva para la cuantificación de NADP(H).....	80
Tabla 11. Tabla de concentraciones y valores de absorbancia de la curva para la cuantificación de NAD(H).....	81
Tabla 12. Tabla de características de los iniciadores usados para la qPCR	82

1. ABREVIATURAS

°C	Centígrados
6PGD	6-fosfogluconato deshidrogenasa
ACC	AcetilCoA carboxilasa
AcetilCoA	Acetilcoenzima A
ACL	ATP citrato liasa
ACP	Proteína transportadora de grupos acilo
AGEs	Productos finales de glicación avanzada
AGH	Ácidos grasos hepáticos
AGL	Ácidos grasos libres
ALT	Alanino aminotransferasa
ANi	Ácido nicotínico
ANOVA	Análisis de varianza
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CEVECE	Centro Estatal de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
ChREBP	Proteína de respuesta de unión a elementos de carbohidratos
CPT-1	Carnitina palmitoil transferasa 1
CT	Ciclo umbral
Ct	Colesterol total
DE	Desviación estándar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	5'-5'ditio-bis(2-nitro-ácido benzoico)
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
F1P	Fructosa-1-fosfato
FAS	Ácido graso sintasa
g	Gramos
G	Gravedades
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Gckr	Proteína reguladora de glucocinasa
GLUT	Transportador de glucosa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido

GSSG	Glutati3n oxidado
HDL	Lipoprote3nas de alta densidad
IDP	Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP
IKK	Inhibidor de NF- κ B
IMC	3ndice de masa corporal
IRS	Sustrato del receptor de la insulina
JNK	Cinasa N-terminal de c-Jun
Kcal	Kilocalor3as
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramos
Km	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
LDL	Lipoprote3nas de baja densidad
LXR	Receptor hep3tico X
M2VP	1-metil-2-trifluorometanosulfonato vinilpiridinio
MDA	Malondialdeh3do
ME	Enzima m3lica o Malato deshidrogenasa descarboxilante dependiente de NADP
mg	Miligramos
Mlx	Max-like factor
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mRNA	3cido ribonucleico mensajero
mTOR	Diana de rapamicina en c3lulas de mam3fero
mU	Miliunidades internacionales
NAD	Nicotinamida adenina dinucle3tido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucle3tido reducido
NADK	Nicotinamida adenina dinucle3tido cinasa
NADP	Nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato reducido
NADPt	Nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato total
NADt	Nicotinamida adenina dinucle3tido total
NAM	Nicotinamida
NAMN	Mononucle3tido del 3cido nicot3nico
NAMpt	Nicotinamida fosforribosil transferasa
NF- κ B	Factor nuclear κ potenciador de c3lulas B activadas

nm	Nanómetro
NMN	Mononucleótido de nicotinamida
NMRAL	NmrA-like family domain-containing protein 1
OMIM	Herencia mendeliana del hombre en línea (Online Mendelian Inheritance in Man)
OMS	Organización Mundial de la Salud
p/v	Peso/volumen
PARP	Poli-ADP ribosa polimerasa
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PGC1 β	Coactivador 1 β de PPAR γ
PICD	Isocitrato deshidrogenasa peroxisomal
PKC	Proteína cinasa C
PP	Preventivo de la pelagra
PP2A	Proteína fosfatasa 2
PPAR γ	Receptor activado de proliferación de peroxisomas γ
PTP1B	Proteína fosfatasa de tirosina 1B
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SCD1	EstearoilCoA desaturasa
SIRT	Sirtuína
SREBP	Proteína de unión de respuesta a elementos de esteroides
SRSR3	Factor de empalme 3 rico en arginina y serina
Tag	Triacilglicéridos
TEA	Trietanolamina
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UPR	Respuesta a proteínas no plegadas
X5P	Xilulosa-5-fosfato

2. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la obesidad y al sobrepeso como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser nocivo para la salud. Normalmente el Índice de Masa Corporal (IMC), indicador de relación entre el peso y la talla, se utiliza para identificar el sobrepeso y obesidad en adultos. Un IMC igual o superior a 25 determina sobrepeso, mientras que igual o superior a 30 determina obesidad (Organización Mundial de la Salud, 2015). En general, el sobrepeso y la obesidad, reflejan un conjunto de complejas interacciones entre factores genéticos, metabólicos, culturales, ambientales, socioeconómicos y de comportamiento (Malik, Schulze, & Hu, 2006).

Ambos padecimientos se encuentran entre los principales problemas de salud pública en México, ocupando la población infantil el primer lugar a nivel mundial y el segundo en adultos. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012, el 69.4% de los hombres y el 73.0% de las mujeres presenta sobrepeso u obesidad, mientras que la Secretaría de Salud del Distrito Federal (2015) (actualmente Ciudad de México) menciona que la capital mexicana cuenta con 2.3 millones de mujeres mayores de 20 años, 1.8 millones de hombres en el mismo intervalo de edad y 481 mil niños en edad escolar, que presentan obesidad o sobrepeso.

En el mundo las tasas de obesidad se han incrementado drásticamente en las últimas décadas, sobre todo en mujeres en edad reproductiva y en niños en edad escolar y adolescentes. A principios del siglo XXI la OMS declaró como “epidemia global” a la obesidad (López & Rodríguez, 2008). A partir de 1980 estimó que la población con obesidad incrementó a más del doble a nivel mundial, mientras que en 2014 más de 1900 millones de adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso, de los cuales más de 600 millones eran obesos (Organización Mundial de la Salud, 2015).

Las consecuencias de estos trascendentales padecimientos son, entre otras, la mortalidad 12 veces mayor en jóvenes de 25 a 35 años, gastos del 22 a 34% superiores del ingreso familiar, 25% de las incapacidades laborales son problemas

derivados de la obesidad y tres de cada cuatro camas de hospital las ocupan pacientes con enfermedades relacionadas a la obesidad (Secretaría de Salud del Distrito Federal, 2015).

2.1. Influencia de la dieta con alto contenido energético

El peso corporal del individuo depende del balance energético, manteniéndose estable mientras el gasto energético se equilibre con la ingesta. Por lo tanto, la regulación de las señales de apetito-saciedad tienen una función importante sobre el peso corporal del individuo. El proceso de regulación se lleva a cabo a nivel de sistema nervioso central y periférico. Las señales periféricas incluyen a leptina, péptido YY y ghrelina producidos por el tejido adiposo, las células L del íleon y yeyuno, y el estómago respectivamente. La ghrelina estimula la ingesta de alimento (Wren, y otros, 2001), en contraste con leptina y el péptido YY que inducen la sensación de saciedad (Friedman & Halaas, 1998; Batterham, y otros, 2002). Estas señales periféricas actúan a nivel del núcleo arcuato del hipotálamo estimulando dos poblaciones neuronales. Una población co-expresan el péptido similar a Agouti y el neuropéptido Y con efectos orexigénicos. La otra población libera el transcrito regulado por cocaína y anfetamina y la proopiomelanocortina, ambos con efectos anorexigénicos. También tienen una función importante otros núcleos hipotalámicos y el tronco encefálico, así como la insulina, que presenta un efecto anorexigénico (Druce & Bloom, 2006).

Los pequeños desequilibrios energéticos suelen compensarse aumentando el gasto o la ingesta según se requiera. Sin embargo, cuando el desequilibrio es importante, el exceso energético se acumulará como grasa. Es aquí donde la gran disponibilidad de alimentos y bebidas de gran densidad energética, asociado a un estilo de vida sedentario, son decisivos para la prevalencia del sobrepeso y la obesidad (Gil, 2015). Con esta apreciación se ha observado un incremento en el consumo energético total en todas las razas/etnias, edades, y niveles económicos. Se estima que aproximadamente 50% del incremento de la ingesta calórica diaria proviene del consumo de bebidas edulcoradas altas en calorías, como el refresco. Además, se ha observado un incremento considerable en la ingesta de azúcar en los últimos 40

años (Duffey & Popkin, 2007), donde en México se consumen 163 L de refresco por persona al año (CEVECE, 2014). Por ello el consumo de bebidas edulcoradas tiene una importante contribución a la epidemia del sobrepeso y la obesidad, en virtud además de una baja saciedad y una incompleta compensación de la energía total consumida (Malik, Schulze, & Hu, 2006). Relacionado al consumo de bebidas azucaradas en México hay 318 defunciones por millón de adultos, en tanto que a nivel mundial se relacionan 133000 muertes por diabetes, 44000 por enfermedades cardiovasculares y 6000 por cáncer (CEVECE, 2014).

En promedio una lata de refresco, provee 150 Kcal y de 40 a 50 g de jarabe de maíz de alta fructosa, el cual contiene 45% de glucosa y 55% de fructosa. Así, si las calorías de esta bebida son añadidas sin reducir el consumo de otras fuentes energéticas de la dieta, un refresco al día puede generar un aumento de peso de 6.75 Kg en 1 año (Malik, Schulze, & Hu, 2006). Debido al alto contenido de fructosa de las bebidas edulcoradas, se han realizado diversos estudios en los cuales han observado que la fructosa, proveniente de la ingesta o de la degradación de la sacarosa estimula la producción de triacilglicéridos (Tag) en mayor medida que la glucosa (Bray, 2013), mediante este mecanismo la fructosa favorece la obesidad y el sobrepeso. Es aquí donde el metabolismo de la fructosa y la síntesis de ácidos grasos tienen una participación relevante durante el desarrollo del sobrepeso y obesidad.

La fructosa, es un monosacárido presente en frutas dulces y la miel de manera natural, es soluble en agua, alcohol o éter, usado como endulzante y conservador (National Center for Biotechnology Information, 2015). Una vez ingerida, la mayor parte de la fructosa aparentemente se absorbe por transporte facilitado en el yeyuno por el transportador de fructosa GLUT5 (Gil, 2015). Es importante mencionar que hay un incremento significativo de absorción de fructosa cuando es co-ingrida en cantidades equivalentes de glucosa. Después de la absorción, la fructosa es transportada por vena porta al hígado, donde es captada por las células hepáticas (Kolderup & Svihus, 2015). Se absorbe más lentamente que la glucosa, aunque es captada y metabolizada más rápido por el hígado (Gil, 2015), el cual contiene

GLUT2 (DeBosch, Chen, Saben, Finck, & Moley, 2014), GLUT8 (Uldry & Thorens, 2004) y abundante GLUT5, proteínas transportadoras que facilitan la entrada de fructosa (Bray, 2013). El GLUT2 tiene igual especificidad para glucosa y fructosa, GLUT5 es específico de fructosa y GLUT8 se ha observado que es un mediador de la captación de fructosa por el hepatocito que contribuye a una esteatosis macro y microvesicular (DeBosch, Chen, Saben, Finck, & Moley, 2014).

La fructosa se metaboliza mediante la conversión en intermediarios de la vía glicolítica (Figura 1), aunque la fructosa entra en un estadio más tarde en la vía glicolítica que la glucosa (Kolderup & Svihus, 2015). En la mayor parte de los tejidos la fructosa se fosforila por la hexoquinasa hasta fructosa-6-fosfato, intermediario glucolítico. Sin embargo, en el hepatocito sigue una ruta diferente; se fosforila para dar fructosa-1-fosfato (F1P) por la cetohexoquinasa o fructosa quinasa. La F1P se escinde por la acción de la aldolasa B, para dar lugar a dihidroxiacetona-fosfato y gliceraldehído. El gliceraldehído, para poder metabolizarse, tiene que fosforilarse por la triosaquinasa, originando gliceraldehído-3-fosfato, ingresando junto con la dihidroxiacetona-fosfato en la vía glicolítica a nivel de triosas fosfato.

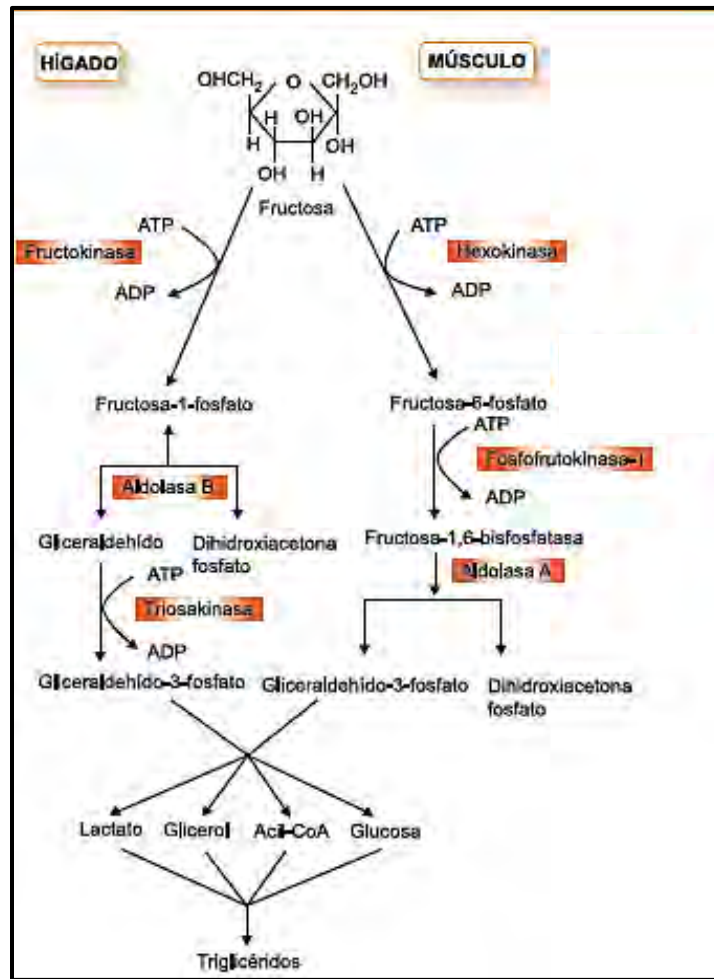


Figura 1. Metabolismo de la fructosa en hígado y en músculo (Gil, 2015).

La regulación del procesamiento hepático de la fructosa se da principalmente a nivel de sustrato (bajo Km) (Feinman & Fine, 2013), esta vía de utilización de fructosa evita la etapa de control de la fosfofructoquinasa 1 (Gil, 2015). Ni la fructoquinasa ni la aldolasa B son inhibidas por ATP (Adenosina trifosfato) o citrato, por lo tanto, no son reguladas por el nivel energético celular. Como consecuencia en ausencia de ésta inhibición por retroalimentación, la fructosa ingerida es rápidamente convertida en triosas-fosfato en el hígado. Estos sustratos son subsecuentemente oxidados en los hepatocitos o convertidas en glucosa y lactato para ser liberados al torrente sanguíneo, o convertidos en glucógeno. Una pequeña pero significativa cantidad es transformada en Tag a través de la lipogénesis *de novo* (Tappy, Lê, Tran, & Paquot,

2010). La síntesis de ácidos grasos requiere de una fuente citosólica de acetilcoenzima A (AcetilCoA) y de poder reductor (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido, NADPH), donde ambos actúan como factores limitantes (Gil, 2015).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Lipogénesis *de novo*

La lipogénesis *de novo* (Figura 2) es un proceso por el cual lípidos son sintetizados endógenamente a partir de la dieta, generalmente carbohidratos o depósitos energéticos (Softic, 2016). Los ácidos grasos producidos durante la lipogénesis *de novo* son posteriormente reesterificados junto con moléculas de glicerol fosfato para la formación de Tag. En condiciones normales ésta vía biosintética se lleva a cabo en el hígado y tejido adiposo, aunque la vía es más eficiente en hígado que en tejido adiposo (Ameer, Scandiuizi, Hasnain, Kalbacher, & Zaidi, 2014).

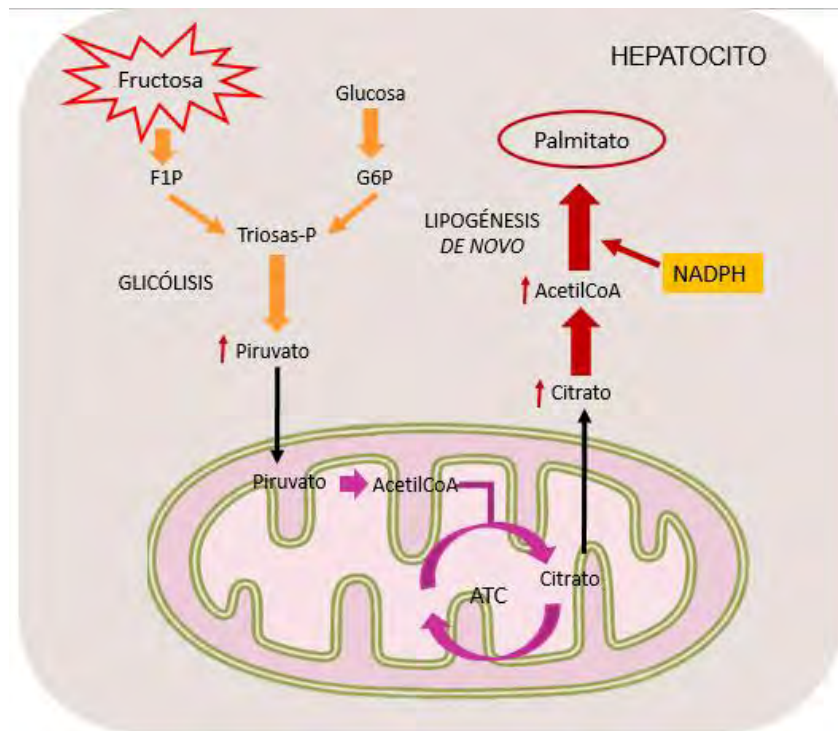


Figura 2. Panorama general de la lipogénesis *de novo*. Figura de elaboración propia.

La fuente de AcetilCoA proviene del piruvato, producto final del metabolismo citoplasmático de los carbohidratos. El AcetilCoA es utilizado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos para la producción de energía, cuando las reservas de energía están completas, intermediarios del ciclo se acumulan y son transportados desde la mitocondria hacia el citoplasma por sistemas de transporte (Softic, 2016). Ya en el

citoplasma se lleva a cabo la síntesis de ácidos grasos, aquí los intermediarios se asocian a una proteína transportadora denominada proteína transportadora de grupos acilo (ACP), ello permite que estos compuestos hidrófobos se muevan en el medio acuoso. El ácido graso se construye por la adición secuencial de unidades de dos átomos de carbono, y el punto de partida es el AcetilCoA. El dador de carbonos es el MalonilCoA, producto de la carboxilación del AcetilCoA por la AcetilCoA carboxilasa, esta reacción requiere biotina ya que es parte integral de la enzima. Tanto AcetilCoA como MalonilCoA se unen a las proteínas ACP y sobre ella se origina la síntesis. En el caso de los ácidos grasos de número par de átomos de carbono se parte de acetil-ACP, mientras para los de número impar se parte de propionil-ACP (Gil, 2015).

Los procesos fundamentales para la lipogénesis *de novo* son la síntesis de acetoacetilo, a partir de la unión y descarboxilación de malonilo y acetilo; la producción de butirilo mediante reducciones y deshidratación del acetoacetilo; y finalmente iniciar el ciclo con otro malonilo. El proceso termina con la biosíntesis de palmitato, que es el producto principal de ésta vía. A partir del palmitato pueden producirse otros ácidos grasos de cadena más larga o ácidos grasos insaturados. Dicho proceso se da en el retículo endoplásmico (Gil, 2015).

La elongación del ácido graso se produce por adición de unidades de MalonilCoA, así se pueden sintetizar cadenas de hasta 20 átomos de carbono. Por otra parte, la insaturación la llevan a cabo complejos enzimáticos de membrana denominados desaturasas y pueden producirse hasta tres dobles enlaces, aunque en el humano existe la incapacidad de introducir dobles enlaces más allá del átomo de carbono 9 (Gil, 2015).

Una vez que se han producido los ácidos grasos, estos son utilizados para la síntesis de Tag. En los Tag, los tres grupos hidroxilo del glicerol están esterificados con ácidos grasos. La distribución y composición de los ácidos grasos dependen de muchos factores, entre ellos la dieta (Gil, 2015). La síntesis de Tag se lleva a cabo fundamentalmente en el intestino, hígado y tejido adiposo. En el hígado se produce su síntesis a partir de ácidos grasos circulantes en el plasma o los sintetizados de

la vía de lipogénesis. Es importante el aporte de glicerol, obtenido a partir del glicerol-1-fosfato, intermediario del metabolismo de los glúcidos (Gil, 2015).

La vía de lipogénesis *de novo* ha sido estudiada tanto en modelos animales (rata, ratón) como en humanos. A partir de estos estudios se conoce que una dieta alta en fructosa induce hipertrigliceridemia, por lo cual se relaciona a la fructosa como un carbohidrato estimulador de la lipogénesis. Los experimentos en ratas con dietas de fructosa al 70% han demostrado que el 15% de palmitato en lipoproteínas de muy baja densidad proviene de lipogénesis *de novo*. Lo anterior se justifica ya que diversos estudios mencionan que la ruta no es preponderante cuando hay un exceso en la ingesta de carbohidratos, sino que se activa una vez que las reservas de glucógeno se encuentran al máximo. También se ha determinado por medición calorimétrica indirecta en humanos que la vía presenta un ciclo circadiano, ya que durante el día tiene mayor actividad, mientras que en la noche se da la movilización y oxidación de lípidos (Hellerstein, 1999).

3.2. Regulación de la lipogénesis *de novo*

La vía es regulada mediante la expresión de genes glicolíticos y lipogénicos mediado por factores de transcripción que activan genes adicionales que también participan en la regulación de la captación, tráfico y almacenamiento de lípidos (Rui, 2014). Las dietas ricas en carbohidratos producen cambios en la expresión de diferentes genes, directamente o a través de la insulina (Gil, 2015). Se ha determinado que el exceso de glucosa-6-fosfato (G6P) induce la expresión de AcetilCoA carboxilasa (ACC), el complejo de ácido graso sintasa (FAS), la ATP citrato liasa (ACL), de G6PD, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD) y la enzima málica (ME) (Gil, 2015) (Girard, Ferré, & Foufelle, 1997).

Dentro de los factores de transcripción involucrados están el receptor activado de proliferación de peroxisomas y (PPAR γ), la proteína de respuesta de unión a elementos de carbohidratos (ChREBP) y la proteína de respuesta de unión a elementos de esteroides (SREBP). ChREBP es un regulador clave, pues se une y

activa al promotor del gen de piruvato cinasa en hepatocitos, además estimula la expresión de enzimas importantes para la lipogénesis *de novo* como ME, ACL, ACC, FAS, ácido graso-CoA elongasa y Esteroil-CoA desaturasa (SCD1) (Girard, Ferré, & Fougère, 1997). Los carbohidratos llevan a cabo la regulación de ChREBP por medio de un sistema de fosforilación/desfosforilación, donde un intermediario de la vía de las pentosas-fosfato, la xilulosa-5-Fosfato (X5P), activa a la proteína fosfatasa 2 (PP2A), que desfosforila al residuo Ser196 lo que permite la traslocación de ChREBP al núcleo. Así mismo la X5P puede inducir la defosforilación de Thr666 dentro del núcleo, lo que activa a ChREBP y permite su posterior interacción con el DNA (Uyeda, Yamashita, & Kawaguchi, 2002). Además de X5P, la G6P se une y activa a ChREBP, mientras que fructosa-1,6-bifosfato promueve su traslocación al núcleo. Otro mecanismo regulador a través de los carbohidratos es mediante la glucosa, debido a que promueve la acetilación en los residuos Lys672, incrementando la actividad de ChREBP (Rui, 2014).

En cuanto a SREBP-1c se ha relacionado su sobreexpresión con una ingesta alta de fructosa (Schultz, Neil, Aguila, & Mandarim-de-Lacerda, 2013). SREBP estimula la expresión de diversos genes que controlan la captación de ácidos grasos, su tráfico, así como también la biosíntesis de Tag en el hígado, como Acetil-CoA carboxilasa, FAS, Esteroil-CoA desaturasa 1 y 2, ACL, ME y ACC. En ratones con una dieta alta en carbohidratos existe una sobreexpresión de SREBP, éste a su vez promueve la expresión de PPAR γ (Shimano, 2001). Debido a la alta expresión de ChREBP, SREBP y PPAR γ , se obtiene un efecto sinérgico para la inducción en la expresión de enzimas lipogénicas.

Además de la disponibilidad de la regulación de la expresión de enzimas lipogénicas por factores transcripcionales, existe una regulación a partir de la disponibilidad de sustrato y cofactor. Los carbohidratos de la dieta son los que orquestan la lipogénesis *de novo*, esto mediante la obtención de piruvato a través de la vía glicolítica. Por otro lado, como se mencionó, el NADPH es necesario ya que actúa como una coenzima para FAS, con el fin de reducir la AcetilCoA a ácidos grasos. Sin el importante aporte de poder reductor la vía no puede llevar a cabo su actividad.

El NADPH proviene de reacciones metabólicas catalizadas por la ME, también a partir de la vía de las pentosas fosfato, específicamente de la G6PD y la 6PGD (Rui, 2014), así como también de la enzima citosólica isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (IDP) (Lalotís, Bizelís, & Rogdakis, 2010). La AcetilCoA carboxilasa y FAS son dos enzimas clave en la síntesis de ácidos grasos, ambas junto con G6PD y ME son denominadas enzimas lipogénicas (Gil, 2015).

3.3. Enzimas productoras de NADPH

3.3.1. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)

La vía de las Pentosas Fosfato tiene diversas funciones transcendentales dentro de la célula, una de ellos es la producción de NADPH requerido en los procesos anabólicos (Barcia & Ramos, 2014) y para los sistemas antioxidantes. La G6PD (EC 1.1.1.49) es la enzima limitante y primera de la vía, pertenece a la fase oxidante, y cataliza la transformación de G6P a 6-fosfogluconolactona, con la correspondiente reducción de NADP a NADPH. Así mismo al generarse la 6-fosfogluconolactona, se permite que la siguiente enzima, la 6PGD, también lleve a cabo su actividad, generándose nuevamente NADPH (Stanton, 2012).

El gen de la G6PD tiene una ubicación citogenética Xq28, contiene 13 exones y 12 intrones, un gen altamente conservado. El producto del gen es una proteína de 514 aminoácidos, para ser activa debe formar un dímero (Figura 3) o un tetrámero. Tiene sitios de unión para el NADP y la G6P, donde el NADP es un modificador alostérico que al unirse actúa como un estabilizante del dímero permitiendo a la enzima estar en una conformación tal que la mantiene activa (Stanton, 2012).



Figura 3. Modelo tridimensional del dímero activo de G6PD (Cappellini & Fiorelli, 2008)

Dado que la enzima es limitante de la vía de las pentosas fosfato, su regulación afecta directamente a las consecuentes reacciones de la vía y al importante aporte de NADPH de ésta. Una dieta rica en carbohidratos incrementa su actividad, además se conoce que la enzima está regulada por la relación NADPH/NADP (Barcia & Ramos, 2014), ya que conforme la proporción se reduce la enzima incrementa su actividad para incrementar la poza de NADPH. Lo anterior es uno de los mecanismos por el cual la alta ingesta de fructosa induce el aumento de la actividad de la enzima, pues la síntesis de ácidos grasos requiere NADPH para su acción. Además, el gen de G6PD es regulado de manera positiva a través del factor de transcripción SREBP, siendo así un segundo mecanismo regulador por parte de los carbohidratos (Stanton, 2012).

3.3.2. Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (IDP)

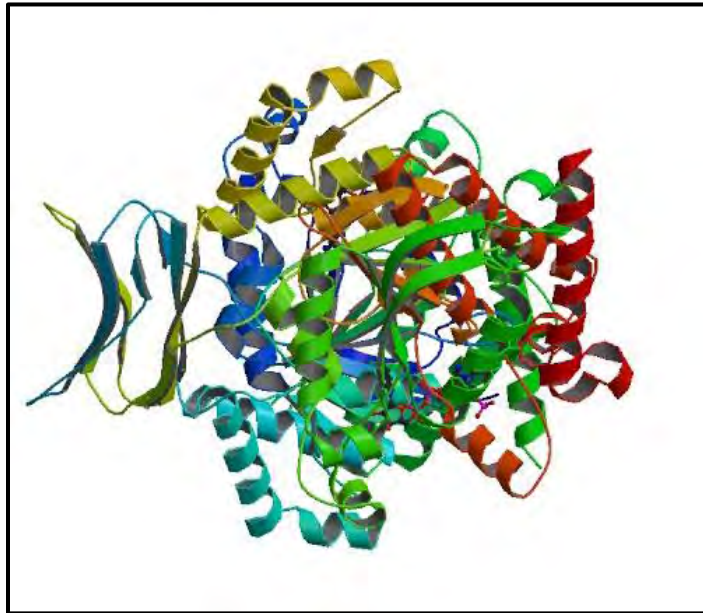


Figura 4. Modelo tridimensional de la enzima IDP (Xu, y otros, 2004).

Las enzimas isocitrato deshidrogenasa catalizan la descarboxilación oxidativa del ácido isocítrico a α -cetoglutarato, la reacción es nucleótido dependiente. La enzima existe en 2 distintas subclases, una que utiliza NAD^+ y presenta propiedades alostéricas (isocitrato deshidrogenasa 3) (EC 1.1.1.41); y otras que utilizan NADP y no presentan propiedades alostéricas (IDP e isocitrato deshidrogenasa 2) (Geisbrecht & Gould, 1999). La enzima dimérica IDP (EC. 1.1.1.42) (figura 4) dependiente de NADP es una fuente citoplasmática de NADPH (Yañez, Soriguer, Villar, & Pachon, 1975), y se relaciona la existencia de esta enzima citoplasmática con el importante aporte de NADPH para las vías localizadas en este compartimento celular (Geisbrecht & Gould, 1999).

Si bien las enzimas G6PD y ME son importantes para el aporte de NADPH citoplasmático, se sabe que la IDP en hígado de rata presenta una actividad de hasta 16 y 18 veces mayor, respectivamente, por lo que se infiere que la enzima IDP es la enzima principal para el aporte total de NADPH y por lo tanto para el mantenimiento de las vías biosintéticas que ocupan a esta coenzima y además para

el mantenimiento del balance redox de la célula. Se han realizado experimentos en ratones donde se ha encontrado que la expresión es mayor en hígado y en riñón en condiciones normales (Min, y otros, 2002).

El gen que codifica la enzima se denomina IDP o PICD (Isocitrato deshidrogenasa peroxisomal), contiene 10 exones y tiene una localización citogenética 2q34. El gen posee una región reguladora de unión a SREBP, por lo cual la expresión de IDP puede ser regulada por SREBP1a y SREBP2 en menor medida, lo que indica una regulación coordinada con la vía de lipogénesis *de novo* y además resalta su importancia como enzima importante para la producción de NADPH para que se lleve a cabo la síntesis de ácidos grasos (Shechter, Dai, Huo, & Guan, 2003).

3.3.3. Malato deshidrogenasa descarboxilante dependiente de NADP (Enzima málica, ME)



Figura 5. Modelo tridimensional de la enzima ME (Papagrorgiou, y otros, 2005)

La ME (EC 1.1.1.40) (Figura 5) forma parte de un grupo de enzimas que denominadas con el mismo nombre dependientes de NADP. La ME se encuentra

en el citosol, mientras que malato deshidrogenasa 3 se encuentra en mitocondria. La malato deshidrogenasa 2 es diferente, ya que depende de NAD (OMIM, 2013). La ME es una proteína tetramérica y cataliza la decarboxilación oxidativa reversible del malato, formando piruvato CO_2 y NADPH (Zelewski & Swierczynski, 1991).

El gen codificante para la enzima tiene una ubicación citogenética 6q14.2 y contiene numerosas regiones de reconocimiento para diversos factores de transcripción, entre ellos SREBP, por lo cual ésta bajo una regulación compleja (OMIM, 2013). La expresión del gen aumenta cuando un hay aporte importante de carbohidratos a la dieta. En humano la enzima es un tetrámero de 251 KDa compuesto por subunidades idénticas.

Dada la producción de piruvato es un puente entre la vía glicolítica y el Ciclo de Krebs (OMIM, 2013). Sin embargo, la importancia de ésta enzima radica en la producción de NADPH para la síntesis de ácidos grasos, ya que se ha encontrado una mayor cantidad de ME (90%) en el citoplasma de los hepatocitos; compartimento celular considerado lipogénico en los humanos (Zelewski & Swierczynski, 1991).

3.4. Nicotinamida

La niacina, conocida también como Vitamina B3 o factor PP (preventivo de la pelagra) es un nombre asignado a dos sustancias químicas diferentes, la nicotinamida (NAM) y el ácido nicotínico (ANi) (Gil, 2015), donde la NAM es la forma amida del ANi (Rolfe, 2014) (Figura 6). Tanto la NAM como el ANi son solubles en agua y en alcohol, estables al calor, la luz, a la oxidación y los cambios de pH (Gil, 2015).

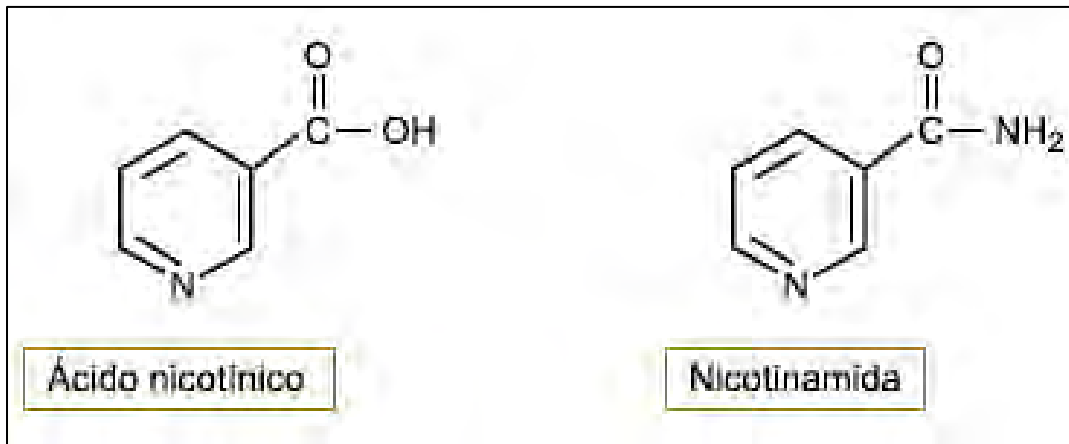


Figura 6. Estructura química de ácido nicotínico y nicotinamida (Gil, 2015).

La NAM se encuentra en diversos alimentos, fuentes ricas de esta vitamina son la carne, el pescado y el trigo, y en menor medida en los vegetales (Rolfe, 2014). La NAM puede ser sintetizada a partir del triptófano en el hígado, mediante la síntesis primaria de ANi (Shibata, Fukuwatari, & Suzuki, 2014). Los requerimientos diarios de niacina son 16 mg para hombres y 14 mg para mujeres, durante el embarazo y lactancia deben consumirse 18 y 17 mg diarios respectivamente. La deficiencia de la vitamina produce la enfermedad conocida como pelagra (Gil, 2015).

A pesar de que las dos sustancias poseen características similares, tienen funciones farmacológicas distintas. La NAM previene el desarrollo de diabetes inducida por streptozotocina, además que con una ingesta de grandes cantidades de NAM, disminuye la ganancia de peso en ratas jóvenes (Shibata, Fukuwatari, & Suzuki, 2014). Así también en conejos con dieta suplementada en niacina previene la acumulación hepática de lípidos, disminuyendo significativamente la actividad de FAS y el receptor de adiponectina 2 y la cantidad de mRNA de AcetilCoA carboxilasa (Liu, Fu, & Li, 2016).

La NAM al ser ingerida se absorbe en el intestino delgado mediante difusión facilitada, que se complementa con un mecanismo de difusión pasiva cuando aumentan las cantidades ingeridas. Una vez en torrente sanguíneo la NAM se encuentra libre y es captada por las células mediante difusión pasiva (Gil, 2015),

dándose en hígado la mayor incorporación de NAM (Shibata, Fukuwatari, & Suzuki, 2014).

La NAM en el hepatocito es metabolizada de igual manera tanto en ratas como en humanos. Es metilada para formar N1-metilnicotinamida, principal metabolito de excreción, ésta a su vez puede ser metabolizada a N1-metil-2-piridona-5-carboxamida y N1-metil-4-piridona-3-carboxamida. En exceso de ingesta de NAM, ésta es convertida a óxido de NAM (Shibata, Fukuwatari, & Suzuki, 2014). El metabolito de mayor importancia es el mononucleótido de NAM (NMN), siendo éste el precursor directo para la obtención de NAD.

3.5. Nucleótidos de piridina

La NAM adenina dinucleótido (NAD) y su forma fosforilada (NADP), como sus respectivas formas reducidas (NADH y NADPH) (Figura 7), son moléculas importantes del metabolismo celular y la producción de energía (Belenky, Bogan, & Brenner, 2006), participando aproximadamente en 200 reacciones diferentes, incluyendo el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos (Gil, 2015).

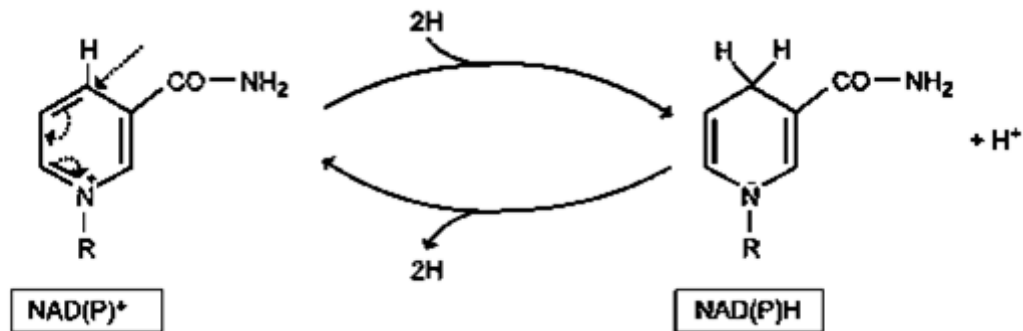


Figura 7. Formas oxidada y reducida de NAD(P) (Gil, 2015).

Su participación se da en reacciones de óxido reducción, como acarreadores electrónicos, contribuyendo con el mantenimiento del equilibrio redox dentro de la célula, supervivencia celular y muerte (Nakamura, Bhatnagar, & Sadoshima, 2011). En general, el NAD participa en mayor medida con enzimas mitocondriales unidas a la cadena respiratoria, en tanto que el NADP colabora con enzimas

citoplasmáticas, siendo el NADPH utilizado en diversos procesos biosintéticos. Además, NAD tiene una función como donador de adenosina difosfato-ribosa para ciertas proteínas, estando estas proteínas implicadas en funciones como la replicación del DNA, regulación de la transcripción y la reparación del DNA (Gil, 2015).

La biosíntesis de estas coenzimas es mediante vías de salvamento, o bien a partir de la síntesis *de novo*, por la vía de Preiss-Handler a partir del triptófano. En la vía de Preiss-Handler se genera ácido quinolínico que posteriormente es convertido a ANi mononucleótido (NAMN) mediante la quinolato fosforribosiltransferasa. NAMN es posteriormente adenililado por la ANi mononucleótido adenililtransferasa para producir ANi adenina dinucleótido, el cual es posteriormente amidado por la NAD sintasa para producir NAD (Nakamura, Bhatnagar, & Sadoshima, 2011).

Mediante las vías de salvamento se obtiene NAD a partir de ácido nicotínico, NAM o ribósido de NAM generados como consecuencia del metabolismo de NAD o de fuentes alimentarias. El ácido nicotínico es convertido a NAMN mediante la ANi fosforribosiltransferasa. NAM es convertida a NMN por NAM fosforribosiltransferasa, para después el NMN ser adenililado por NAM/ANi mononucleótido adenilil transferasa y formar NAD, en tanto que el ribósido de NAM es usado para generar NMN por la ribósido de NAM cinasa (NADK). Una vez sintetizado el NAD, éste es fosforilado por NAD cinasa para generar NADP (Nakamura, Bhatnagar, & Sadoshima, 2011) (Figura 8), el grupo fosfato es introducido en el hidroxilo ubicado en la posición 2' de la adenosina ribosa. La producción de NADP es dependiente de la disponibilidad de NAD.

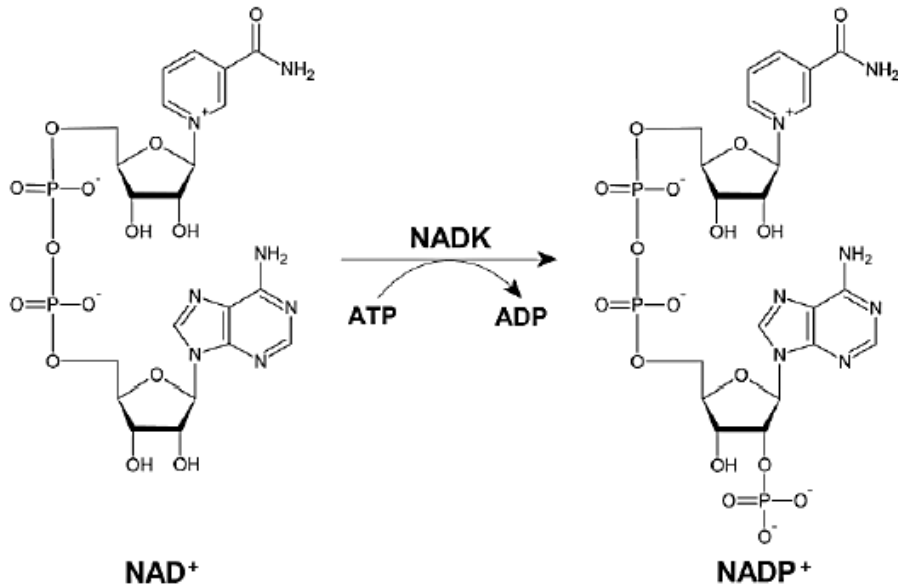


Figura 8. Formación de NADP catalizada por NADK (Agedal, Niere, & Ziegler, 2010).

Se han realizado diversos estudios donde se ha comparado la eficiencia de NAM y ANi como precursores de las coenzimas NAD y NADP, concluyendo que NAM incrementa considerablemente la concentración de NAD en hígado de ratas (Shibata, Fukuwatari, & Suzuki, 2014), debido a que NAM tiene un mayor tiempo de vida media tanto en hígado como en torrente sanguíneo (Petrack, Greengard, & Kalinsky, 1966).

3.6. Importancia de NADPH en el metabolismo celular

NADPH tiene una función destacada dentro de la célula como detoxificador, ya que es parte de los mecanismos de defensa contra el estrés oxidante. Existen diversos mecanismos de defensa contra las especies reactivas de oxígeno y prevenir así el daño por oxidación. Entre estos mecanismos destaca el glutatión, las tioredoxinas, catalasa, superóxido dismutasa y glutatión S-transferasa. Para el mantenimiento y regeneración de estos sistemas de defensa se requiere al NADP como agente reductor (Agedal, Niere, & Ziegler, 2010).

Como detoxificante también participa en la continua regeneración de las enzimas Citocromo P450, llevada a cabo por las Citocromo P450 reductasas dependientes de NADPH. El mantenimiento de los citocromos permite la biotransformación de

diversos xenobióticos dañinos y con ello su posterior eliminación (Agledal, Niere, & Ziegler, 2010).

Dentro de las reacciones anabólicas el NADPH actúa como un reductor. En la síntesis de aminoácidos como glutamato y prolina es necesaria la presencia de NADPH, lo que convierte a esta coenzima en una molécula crítica para la síntesis de proteínas. Se encuentra indirectamente relacionado con la síntesis de DNA, ya que permite la reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos por la ribonucleótido reductasa. Igualmente es crucial para la lipogénesis *de novo*, pues sin la coenzima la AcetilCoA no puede reducirse y por lo tanto no hay producción de ácidos grasos. La coenzima en su forma oxidada es necesaria para la síntesis de Tag (Agledal, Niere, & Ziegler, 2010).

Por lo anteriormente descrito, el hecho que tres sean las enzimas que aportan NADPH, G6PD, IDP y ME, influye drásticamente sobre la concentración de la coenzima repercutiendo en mantener la síntesis de ácidos grasos *de novo* y a la enzima prooxidante como NADPH oxidasa siempre y cuando haya un consumo alto y crónico de fructosa. Por lo tanto, el utilizar NAM como posible regulador de las enzimas deshidrogenasas dependientes de NADP abre la posibilidad de frenar la lipogénesis, el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria; mantienen las concentraciones de NADPH por G6PD, IDP y la ME durante la síntesis de ácidos grasos *de novo* pueden ser blanco para frenar la vía e impedir la formación de ácidos grasos *de novo*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto regulador de nicotinamida sobre la activación de enzimas productoras de NADPH (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP y enzima málica) inducidas por la administración de una solución de fructosa al 40% con la finalidad de frenar la lipogénesis *de novo*.

4.2. Objetivos particulares

- Realizar registro de consumo de alimento, bebida y peso corporal de los animales de experimentación.
- Determinar perfil bioquímico (Ct, Tag, HDL, LDL, insulina) y transaminasas (ALT y AST).
- Determinar ácidos grasos hepáticos y séricos.
- Realizar la prueba de tolerancia a la glucosa
- Evaluar la actividad específica y expresión de G6PD, ME e IDP en homogeneizado de hígado de rata.
- Determinar marcadores de estrés oxidante (GSH, GSSG y MDA).

5. HIPÓTESIS

Siendo la nicotinamida precursor de las coenzimas NAD y NADP, pudiera disminuir la relación NADPH/NADP, a través de la regulación sobre la expresión y actividad de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y enzima málica, y por consiguiente disminuyendo la reducción en la generación de ácidos grasos *de novo*, en ratas con administración de fructosa al 40%.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Materiales

Los químicos fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, USA); Fructosa (Alquimia Mexicana, Ciudad de México, México), RNA later (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), TriPure isolation reagent (ROCHE, Indianapolis, IN, USA), First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), Rat Insulin ELISA kit (ALPCO, New Hampshire, USA), Free Fatty Acid Quantification Kit, NADP/NADPH Quantification Colorimetric kit y NAD/NADH Quantification Colorimetric kit (BioVision, Milpitas, CA, USA) . Los iniciadores para la qPCR fueron manufacturados por Invitrogen (CA, USA).

6.2. Modelo experimental

Se usaron ratas macho cepa Sprague Dawley proporcionadas por el Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, con un peso de 240 ± 10 g al inicio del estudio. Se distribuyeron las ratas de manera aleatoria en 8 grupos, nombrados de la siguiente forma debido a la dieta proporcionada.

1. Control
2. NAM 10
3. Fructosa
4. F+NAM 5
5. F+NAM 10
6. F+NAM 15

Las ratas fueron mantenidas en periodos de luz-oscuridad (12 horas respectivamente), en jaulas limpias y secas, cuartos en condiciones adecuadas de ventilación, temperatura y cambio periódico de cama sanitaria constituida por viruta estéril. La dieta fue a base de Formulab Diet 5008®. La fructosa se preparó al 40% (p/v) en el agua de beber, así como el tratamiento de NAM a 5, 10 y 15 mM.

6.3. Tratamiento

La administración de fructosa al 40% fue *ad libitum* en el agua de beber durante 16 semanas a los grupos de Fructosa, F+NAM 5, 10 y 15. Durante la semana 5 se inició el tratamiento con NAM a las diferentes concentraciones a los grupos de NAM 5, 10 y 15 con y sin fructosa durante 5 días, la administración fue vía oral a una dosis de 8 mL/día/individuo. Al término de la semana 16 se realizó la anestesia y sacrificio de los animales para la obtención de fragmentos de hígado y muestras sanguíneas. Durante todo el estudio se registró individualmente el consumo de alimento, volumen de líquido consumido (agua o fructosa) y la medición de masa corporal.

6.4. Obtención de muestras biológicas

Al término del tratamiento, los animales fueron pesados y anestesiados con 69 mg de pentobarbital por Kg de peso. Se realizó una escisión en la región ventral para exponer la cavidad torácica y abdominal, se procedió al sacrificio del animal por perfusión vía punción cardiaca. Posteriormente se extrajo el hígado y fue colocado en solución isotónica para la eliminación de restos de sangre y coágulos. Se localizó el lóbulo derecho y se procedió a su fragmentación, los fragmentos fueron colocados en PBS 0.1 M pH 7.5 y conservado a -70°C. En el tejido almacenado se determinaron ácidos grasos (AGH), glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH), malondialdehído (MDA), expresión y actividades específicas de G6PD, IDP, ME, y concentraciones de NAD(H) y NADP(H). Las muestras de sangre fueron depositadas en tubos de 13x100 sin anticoagulante y centrifugadas a 3500 rpm (BECKMAN AvantiTM®) por 15 minutos a 4°C para obtención de suero y determinación de perfil bioquímico (Tag, Ct, HDL, LDL), ácidos grasos libres (AGL), MDA, insulina, ALT y AST.

6.5. Determinación de perfil bioquímico

La determinación de las pruebas bioquímicas y transaminasas se realizaron en el suero obtenido de los roedores por los métodos tradicionales de laboratorio,

enzimáticos-colorimétricos en el equipo automatizado ILab 650 diagnostics®, con base en la guía del proveedor para cada una de las determinaciones.

6.6. Prueba de tolerancia a la glucosa

A los 110 días del protocolo experimental se realizó una prueba a la glucosa. La medición de la glucosa basal fue con un ayuno de 8 horas. La muestra de sangre es obtenida por corte sagital en el extremo de la cola de la rata y la concentración de glucosa fue medida con glucómetro Freestyle Optium® (Abbott Laboratories, Madrid, España). Posteriormente se administró una solución de glucosa al 50% (2g/Kg de peso) vía intraperitoneal y se realizaron las determinaciones de glucosa a los 30, 60, 90 y 120 minutos.

6.7. Determinación de insulina y ácidos grasos libres en suero

Las determinaciones de insulina se realizaron con un kit inmunoenzimático marca ALPCO®, siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de la determinación de los ácidos grasos se empleó el kit de Biovision®, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ver curva de cuantificación ver Anexos.

6.8. Lipoperoxidación

La lipoperoxidación fue evaluada por la cuantificación de malondialdehído (MDA), el cual al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico produce un compuesto de color rosa que absorbe a 535 nm (Jentzch, Bachmann, Fürst, & Biesalski, 1996). Brevemente, el homogenizado al 10% fue incubado con ácido tiobarbitúrico 110 mM y ácido fosfórico 200 mM durante 1 hora a 90°C. El MDA fue extraído con 400 µL de n-butanol. La absorbancia de la fase orgánica fue medida en el lector de placas Multiskan EX, Labsystems (Helsinki, Finland). Para ver curva de cuantificación ver Anexos.

6.9. Determinación de glutatión oxidado y reducido

La determinación de GSH se realizó empleando el método de Habbeeb, F., 1996, el cual se basa en la reacción producida entre el reactivo de Ellman (DTNB, 5', 5' ditiobis (2-nitro-ácido benzoico)) y el grupo sulfhidrilo presente en el GSH. El 5-tio-2-nitrobenzoico formado es de color amarillo claro, que es medido a 412 nm. La determinación se llevó a cabo previa preparación de homogeneizados de hígado al 10% (p/v) en ácido metafosfórico al 5%. Los homogeneizados fueron centrifugados a 12000 rpm a 4°C por 10 minutos, para posteriormente obtener el sobrenadante.

En el caso de GSSG se prepararon homogeneizados de hígado al 10% (p/v) en un amortiguador de PBS 0.1 M, pH 7.5. Alícuotas de los sobrenadantes fueron tratados con 1-metil-2-trifluorometanosulfonato vinilpiridinio (M2VP) 10 mM. La determinación se realizó mediante método enzimático (Tietze, F., 1969), el cual emplea M2VP, reactivo que secuestra grupos tioles sin interferir con la enzima glutatión reductasa (GR) presente en la muestra. GSSG es determinado por la reducción a GSH, que a su vez es cuantificado con el reactivo de Ellman a 412 nm. La reducción es catalizada por la GR en presencia de NADPH. Se monitorea el cambio en el desarrollo de color durante la reacción, la velocidad de reacción es proporcional a las concentraciones de GSH y GSSG. Para ver curva de cuantificación ver Anexos.

6.10. Determinación de actividad específica de enzimas productoras de NADPH

Se prepararon homogeneizados de hígado al 10% (p/v) en solución de PBS 0.1M, pH 7.5 con Polytron PT 1200®, se centrifugó a 15000 G a 4°C durante 30 min (BECKMAN Avanti™) y se colectó el sobrenadante. La determinación de proteína se realizó por el método de Bradford (1976), kit obtenido de BioRad® (Hercules, CA, USA). Para ver curva de cuantificación de proteínas ver Anexos.

6.10.1. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La actividad fue determinada en sobrenadante por método de Rudack y col. (1971), mediante el cambio que se produce en la absorbancia por la producción de NADPH. La absorbancia se midió a 340 nm en espectrofotómetro Perkin Elmer (Lambda 25) cada minuto durante 8 minutos. La actividad se expresa en mU/mg de proteína en las condiciones del ensayo. mU es igual a un mmol de NADPH producido por minuto. La reacción es la siguiente:



6.10.2. Isocitrato deshidrogenasa

La actividad de isocitrato deshidrogenasa, se determinó en una dilución 1:1 del sobrenadante por el método descrito por Hans Ulrich Bergmeyer en 1974 y modificado por Díaz, M. (2015), mediante el cambio que se produce en la absorbancia por la producción de NADPH. La absorbancia se mide a 340 nm cada minuto durante 8 minutos. La actividad fue expresada en mU/mg de proteínas en las condiciones de ensayo. La mU es igual a un mmol de NADPH producido por minuto. La reacción es la siguiente:



6.10.3. Enzima málica

La actividad de la enzima se determinó en una dilución 1:1 del sobrenadante, en TRIS 39.16 mM pH 7.5, L-malato 1 mM, NADP 1.1 mM y MgCl₂ 1 mM, mediante el cambio que se produce en la absorbancia por la producción de NADPH. La absorbancia se mide a 340 nm cada minuto durante 8 minutos. La actividad fue expresada en mU/mg de proteínas en las condiciones de ensayo. La mU es igual a un mmol de NADPH producido por minuto. La reacción es la siguiente:



6.11. Extracción de RNA y PCR tiempo real para evaluar expresión de enzimas

EL RNA total fue aislado de los fragmentos de hígado usando el reactivo TriPure® siguiendo las especificaciones del fabricante. Se midió la pureza del RNA a 260 y 280 nm, así como la concentración de RNA obtenido con el equipo Epoch Multi-Volume Spectrophotometer System for Protein and Nucleic Acid Quantification® (BioTek, Vermont, USA). La integridad del RNA fue evaluada con una electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, se visualizó un patrón de bandas correspondientes a las fracciones 18 y 28S del RNA ribosomal utilizando el fotodocumentador Gel Doc EZ Gel Documentation System® (BioRad, CA, USA) (ver anexo). A partir de 2 µg de RNA por muestra se sintetizó el cDNA utilizando el kit First Strand cDNA Synthesis® (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), siguiendo los protocolos del fabricante, en un volumen final de 20 µL. La qPCR fue realizada en un volumen final de 5 µL utilizando el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System® con el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix Synthesis® (Thermo Scientific, Massachusetts, USA); las secuencias de iniciadores de los genes analizados se muestran en la tabla 1. La PCR se realizó por duplicado y las condiciones de reacción fueron las siguientes: iniciar a 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos (95°C por 10 segundos, 61°C por 7 segundos, 72°C por 10 segundos). La cuantificación de los genes fue expresada con niveles relativos de mRNA comparados con el control, se calcularon después de la normalización de 18S con la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabla 1. Tabla de secuencias de iniciadores

<i>Gen</i>		<i>Secuencia de iniciadores</i>	<i>Producto (nt)</i>
<i>G6PD</i>	Forward	5'-CTCGAACCGCATCATAGTGGAG-3'	263
	Reverse	5'-CCTGATGATCCCAAATTCATC-3'	
<i>IDP</i>	Forward	5'-GCTTCATCTGGGCCTGTAAG-3'	194
	Reverse	5'-ATTGGTTGGACGTCTCCTGTC-3'	

<i>ME</i>	Forward	5'-TCAGTTCCTGACTCGATTG-3'	196
	Reverse	5'-CTGTCGTCTTTGGAGGGCTTC-3'	
18S	Forward	5'-ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG	218
	Reverse	5'-CGCTGAGCCAGTTCAGTGTA	

6.12. Determinación de nucleótidos de nicotinamida

Se usaron los kits de cuantificación colorimétricos de NADP/NADPH y NAD/NADH proporcionados por BioVision® (Milpitas, CA, USA). Se prepararon homogeneizados de hígado al 10% (p/v) en el amortiguador de extracción del kit, se centrifugó a 15000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Se colectó el sobrenadante y se adicionó ácido perclórico a una concentración final 0.52 M y posterior incubación en hielo por 15 minutos. Se centrifugó a 15000 rpm a 4°C por 15 minutos y se colectó el sobrenadante. Para neutralizar se agregó KOH 2 M hasta lograr un pH ~7 y posterior incubación en hielo por 15 minutos. Se centrifugó a 15000 rpm a 4°C por 15 minutos. Las determinaciones de los nucleótidos se realizaron en el sobrenadante colectado de acuerdo a lo indicado en la guía del fabricante.

6.13. Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm DE (desviación estándar) de los experimentos realizados. Se realizó la prueba ANOVA de una vía para las comparaciones entre grupos. Se realizaron comparaciones de los grupos de control de NAM y Fructosa contra el grupo Control, así como comparaciones de los grupos de F+NAM contra el grupo de Fructosa mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Todos los cálculos se llevaron a cabo con el software GraphPad Prism 7® (La Jolla CA, USA).

7. RESULTADOS

7.1. Efecto de fructosa sobre el volumen corporal de los animales de experimentación

En la figura 9 podemos observar el efecto de fructosa sobre el volumen corporal de los animales de experimentación al final del tratamiento. Se puede ver que fructosa aumenta el volumen corporal con respecto a la rata del grupo Control.

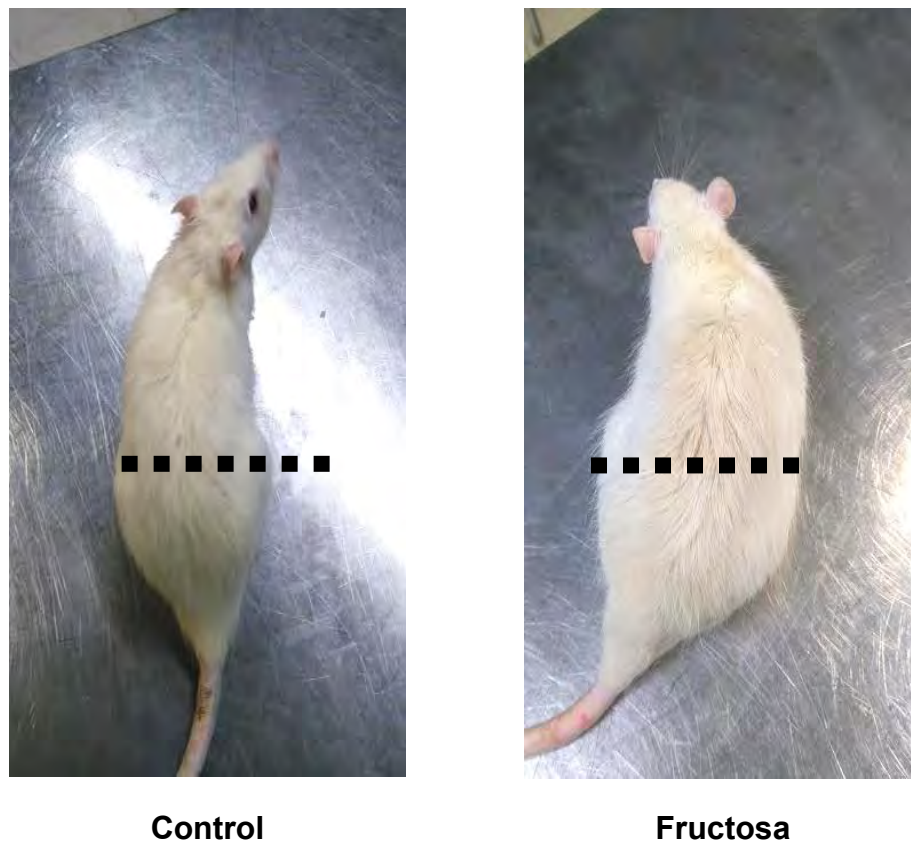


Figura 9. Efecto de fructosa sobre el volumen corporal de los animales de experimentación. Se compara el tamaño de los animales con la línea punteada.

7.2. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la cantidad de grasa corporal de los animales de experimentación

En la figura 10 podemos observar el efecto de fructosa sobre la cantidad de grasa corporal de los animales de experimentación al final del tratamiento. Se puede ver que con el tratamiento de fructosa hay una mayor acumulación de tejido adiposo en comparación con el control. El tratamiento con NAM muestra resultados similares al control. En los grupos de fructosa suplementados con la vitamina, se observa una reducción en la cantidad de tejido adiposo a razón dosis dependiente.

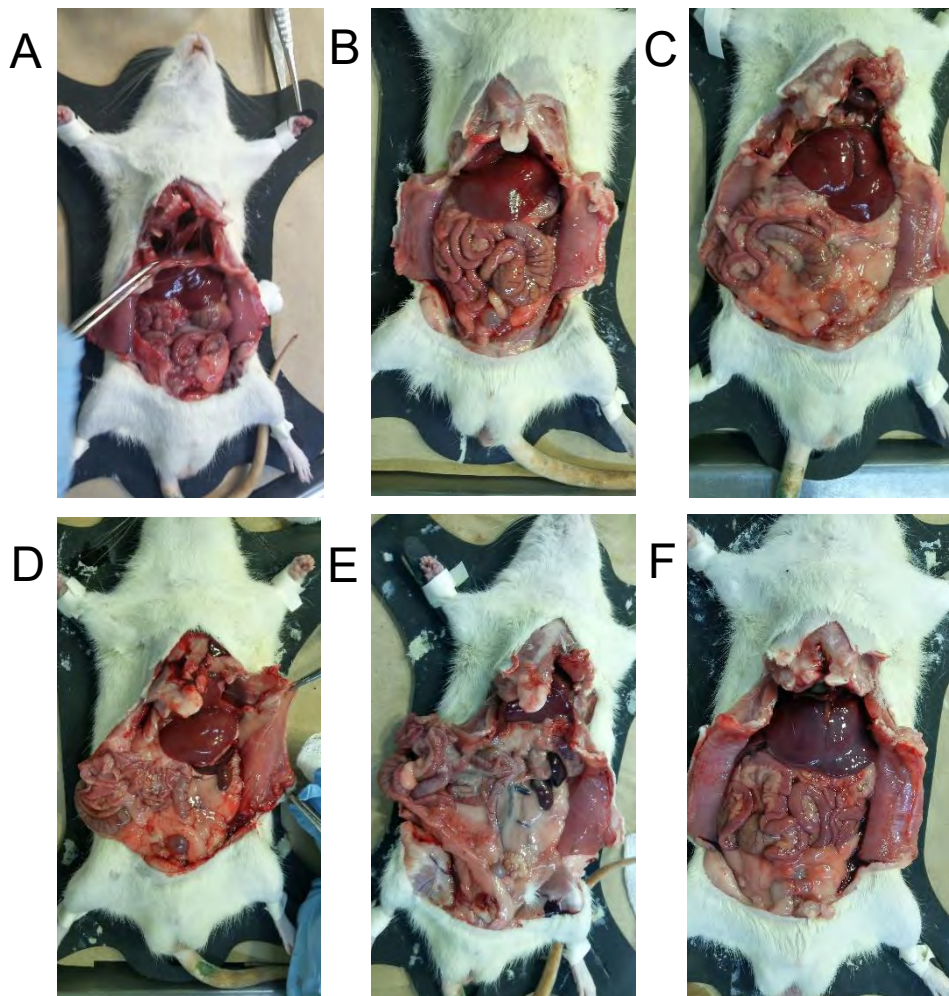


Figura 10. Efecto de fructosa sobre la cantidad de grasa corporal de los animales de experimentación. A: rata grupo Control. B: rata grupo NAM10. C: rata grupo Fructosa. D: rata grupo F+NAM5. E: rata grupo F+NAM10. F: rata grupo F+NAM15.

7.3. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre el consumo de alimento, bebida, ingesta calórica y ganancia de peso

Durante el experimento se observa que el consumo de alimento en los grupos control y NAM10 es uniforme, en tanto que en los grupos suplementados con fructosa hay una disminución de la ingesta de alimento en ~40% con respecto al control. En cuanto al consumo de bebida, únicamente el grupo de NAM10 muestra diferencias significativas teniendo un consumo 23% mayor con respecto al control ($p < 0.001$). La ingesta calórica no muestra diferencias significativas, sin embargo, observamos que los grupos de Fructosa y F+NAM5 presentan una ingesta energética mayor. La ganancia de peso es mayor en el grupo Fructosa en ~30% con respecto al control ($p < 0.05$), mientras que hay una disminución en la ganancia de peso en los grupos de F+NAM10 y 15 contra el grupo de fructosa ($p < 0.05$), siendo similares al grupo Control.

Tabla 2. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre el consumo de alimento, bebida, ingesta calórica y ganancia de peso.

	Control	NAM10	Fructosa	F+NAM5	F+NAM10	F+NAM15
Alimento (g)	773.14±89.11	792.68±127.02	448.19±62.15 ^g	471.25±73.81	434.83±75.03	460.96±81.28
Bebida (mL)	1272.42±126.99	1576.45±147.09 ^e	1290.25±43.55	1113.56±144.41	1198.92±202.39	1153.76±122.84
NAM (mL)	-	288.27±14.43	-	283.90±11.87	268.08±8.10	259.17±6.54
Ingesta calórica (Kcal)	3437.67±919.16	3329.27±533.48	3946.83±252.68	4698.90±360.14	3744.58±595.41	3870.62±494.62
Ganancia peso (g)	259.45±21.02	240.20±47.90	336.33±89.37 ^a	270.67±28.53	251.57±43.00 ^b	250.60±43.87 ^b

Los valores son expresados como la media ± DE de 5 animales por cada grupo. Los resultados de cada parámetro fueron determinados en un periodo mensual, a excepción de ganancia de peso, donde se presenta el peso ganado al término del experimento. Se considera como Consumo de bebida al consumo de solución de fructosa o agua. En a, $p < 0.05$ contra grupo Control; b, $p < 0.05$ contra grupo Fructosa; e, $p < 0.001$ contra grupo Control; g, $p < 0.0001$ contra grupo Control.

7.4. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre los resultados de perfil bioquímico

En la tabla 3 podemos observar que el grupo de NAM10 no presenta diferencias significativas en los datos obtenidos con respecto al control. El grupo Fructosa se encuentra elevado en la mayoría de los parámetros medidos con respecto al control, presentando valores más altos y con diferencias significativas en colesterol total (Ct) (~40%), Tag (~63%), AGL (~50%), AGH (~80%), ALT (~45%), AST (~82%) e insulina (~185%); caso contrario con HDL, donde se observa una reducción de ~30%. En el grupo de F+NAM5 existe un aumento de AGL con respecto a fructosa ($p < 0.05$), sin embargo, en el caso de AGH se observa una disminución de éste parámetro ($p < 0.05$). Existe un efecto benéfico de NAM en el grupo de F+NAM10 y 15, observándose reducción de Tag, AGH, AG, insulina y Ct; así como una elevación significativa de niveles de HDL en el grupo de F+NAM10 ($p < 0.01$). Con respecto a las transaminasas, se observa una mejora en todos los grupos de fructosa suplementados con NAM ($p < 0.0001$).

Tabla 3. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre los resultados de perfil bioquímico

	Control	NAM10	Fructosa	F+NAM5	F+NAM10	F+NAM15
Ct (mg/dL)	65.98±14.75	51.33±2.87	92.21±26.50 ^a	70.07±26.11	82.46±20.43	64.22±8.98 ^b
Tag (mg/dL)	85.82±29.42	105.33±16.26	140.70±29.88 ^g	134.62±23.49	98.83±19.50 ^b	118.00±19.14
HDL (mg/dL)	43.25±11.51	32.67±3.05	29.25±9.38 ^a	38.78±11.44	47.47±7.80 ^d	38.63±4.71
LDL (mg/dL)	21.41±2.93	20.00±1.73	28.14±5.05 ^a	24.00±3.46	21.94±7.67 ^b	21.47±3.83 ^b
AGL (nmol/μL)	1.73±0.26	1.63±0.28	2.60±0.38 ^c	3.41±0.83 ^b	2.10±0.24	2.02±0.24
AGH (nmol/μL)	5.20±0.64	5.57±0.13	9.35±0.29 ^g	6.84±1.06 ^b	5.47±0.71 ^h	5.08±0.63 ^h
ALT (U/L)	24.33±2.20	22.24±2.19	35.48±19.76 ^c	20.98±1.59 ^h	20.53±1.98 ^h	19.65±14.53 ^h
AST (U/L)	62.56±4.32	54.6±7.79	114.25±17.06 ^g	61.92±4.03 ^h	62.00±7.82 ^h	59.48±19.33 ^h
Insulina (ng/mL)	0.667±0.307	0.587±0.584	1.900±0.462 ^e	1.303±0.281	0.728±0.235 ^d	0.619±0.550 ^d

Los valores son expresados como la media ± DE de 5 animales por cada grupo. En a, p<0.05 contra grupo Control; b, p<0.05 contra grupo Fructosa; c, p<0.01 comparado contra grupo Control; d, p<0.01 comparado contra grupo Fructosa; e, p<0.001 comparado contra grupo Control; g, p<0.0001 contra grupo Control; h, p<0.0001 contra grupo Fructosa. Ct, colesterol total; Tag, triacilglicéridos; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; AGL, ácidos grasos libres; AGH, ácidos grasos en homogenado de fragmento de hígado; ALT, alanino aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa.

7.5. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la prueba de tolerancia a la glucosa

Se observa en la figura 11 la respuesta de los animales a la prueba de tolerancia a la glucosa. Observamos una mejor respuesta en el grupo de NAM10, en tanto que los niveles de glucosa en los grupos suplementados con fructosa a los 30 minutos se encuentran elevados con respecto al control. Sin embargo, el grupo de F+NAM10 presenta una mejor respuesta con respecto al tiempo, pues los niveles de glucosa son similares al control a los 120 minutos de la prueba.

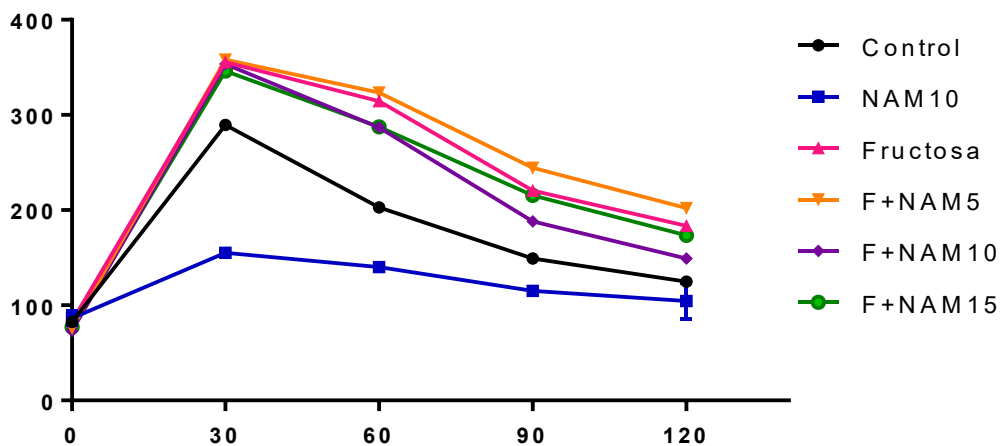


Figura 11. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la prueba de tolerancia a la glucosa. Se presentan los valores de glucosa séricas en la prueba realizada durante 120 minutos. Los valores representan la media de 5 animales por grupo.

7.6. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre el grado de lipoperoxidación

En la figura 12, podemos observar en la gráfica de la izquierda de MDA hepático que existe un incremento significativo de ~92% en el grupo de Fructosa al compararlo contra Control. En los grupos de F+NAM10 y 15 hay un efecto benéfico de NAM, donde se observa reducción de la lipoperoxidación en ~40 y 20% respectivamente al comparar contra el grupo Fructosa. Del lado derecho se observa que MDA en suero incrementa en 100% con respecto al grupo Control ($p < 0.0001$). En lo que respecta a los grupos de Fructosa tratados con NAM se observa un efecto dosis dependiente en la reducción de MDA.

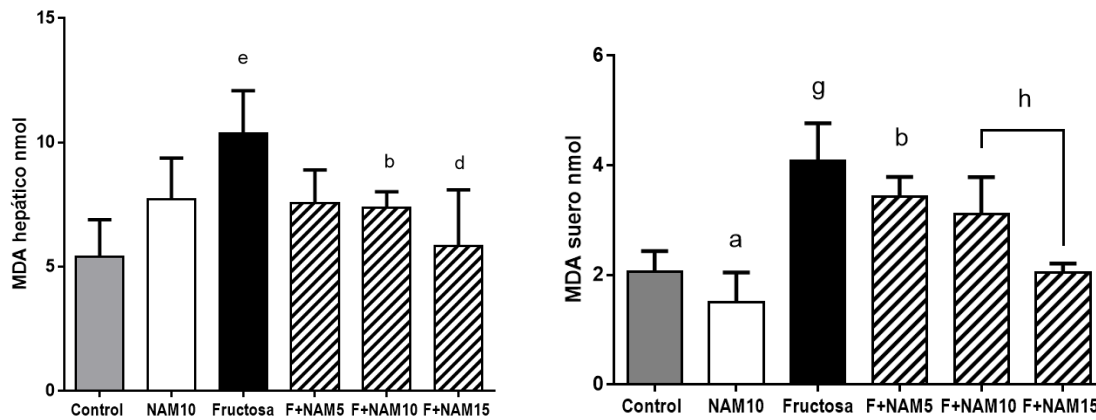


Figura 12. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la concentración de malondialdehído, marcador de lipoperoxidación. A la izquierda, MDA hepático, a la derecha MDA medido en suero. Se muestra la media \pm DE de 5 animales por grupo. En ^a, $p < 0.05$ contra grupo Control, ^b, $p < 0.05$ contra grupo Fructosa, ^d, $p < 0.01$ contra grupo Fructosa, ^e, $p < 0.001$ contra grupo Control, ^g, $p < 0.0001$ contra grupo Control, ^h, $p < 0.0001$ contra grupo Fructosa.

7.7. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la concentración de glutatión reducido y oxidado a nivel hepático

Se observa que existe un decremento de ~27% en la concentración de GSH en el grupo de Fructosa con respecto al Control. Se observa un aumento en la concentración de GSH en los grupos de Fructosa suplementados con NAM en relación dosis dependiente. Por otro lado, se observa un aumento en la concentración de GSSG en el grupo de Fructosa de ~170% con respecto al grupo Control, mientras que existe una reducción de ~40% en la concentración de GSSG en el grupo de Fructosa con NAM 5 y de ~60% en los grupos de Fructosa con NAM 10 y 15.

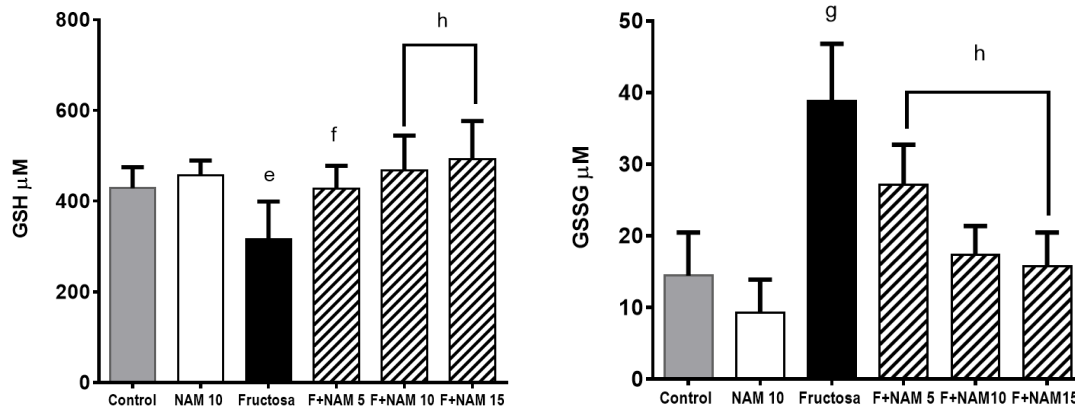


Figura 13. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la concentración de GSH y GSSG a nivel hepático. Se muestra la media \pm DE de 5 animales por grupo. En e, $p < 0.001$ contra grupo Control; f, $p < 0.001$ contra grupo Fructosa; g, $p < 0.0001$ contra grupo Control; h, $p < 0.0001$ contra grupo Fructosa.

7.8. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la expresión y actividad específica de G6PD

En la figura 14 podemos observar que el grupo NAM10 no presenta cambios significativos con respecto al control. Se evalúa el efecto del carbohidrato en el grupo Fructosa, donde se puede ver una inducción de la expresión y la actividad específica (~100%) con respecto al control ($p < 0.0001$ y $p < 0.01$ respectivamente). En los grupos de fructosa con NAM ocurre una reducción de la expresión ($p < 0.01$) y de la actividad con un efecto notable en el grupo de F+NAM15 ($p < 0.05$), llegando en éste caso a ser similar al control.

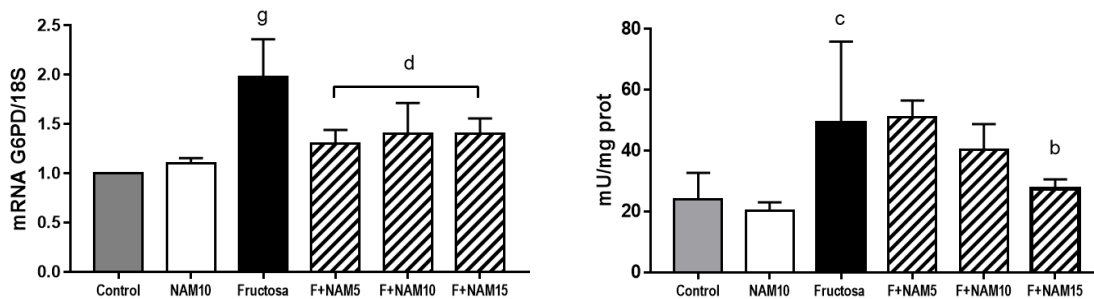


Figura 14. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la expresión y actividad de G6PD. Se muestra la media \pm DE de 5 animales por grupo. En b, $p < 0.05$ contra grupo Fructosa; c, $p < 0.01$ contra grupo Control; d, $p < 0.01$ contra grupo Fructosa; g, $p < 0.0001$ contra grupo Control.

7.9. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la expresión y actividad específica de IDP

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión y la actividad específica de IDP.

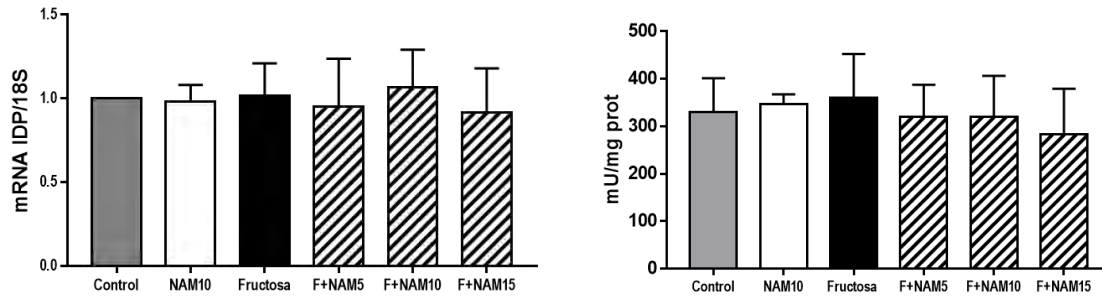


Figura 15. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la expresión y actividad de IDP. Se muestra la media \pm DE de 5 animales por grupo.

7.10. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la expresión y actividad específica de ME

De acuerdo a la figura 16, se observa un aumento de la expresión (~70%) y actividad específica (~125%) en el grupo de Fructosa comparado con el control ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente), en tanto en el grupo de F+NAM15 se observa una reducción de la actividad de manera significativa, presentando un decremento de ~53% ($p < 0.01$) con respecto al grupo Fructosa. La expresión es afectada por la administración de NAM, se aprecia una disminución de esta a razón dosis-dependiente.

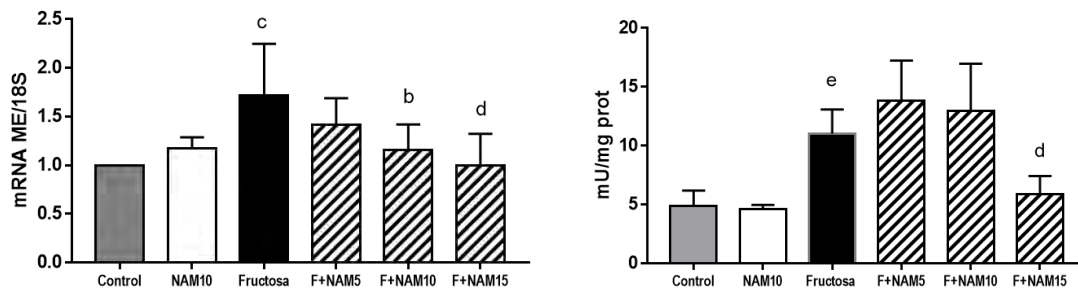


Figura 16. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre la expresión y actividad de ME. Se muestra la media \pm DE de 5 animales por grupo. En b, $p < 0.05$ contra grupo Fructosa; c, $p < 0.01$ contra grupo Control; d, $p < 0.01$ contra grupo Fructosa; e, $p < 0.001$ contra grupo Control.

7.11. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre NAD(H) y NADP(H)

De acuerdo a los datos de la tabla 4 se puede observar que los grupos de NAM10 y Fructosa presentan diferencias significativas con respecto al control. Hay un decremento en los valores de NAD, NADt, NADP y NADPt en el grupo de NAM10 con respecto al control, en tanto que existe un aumento en la relación NADH/NAD, NADPH y la relación NADPH/NADP con respecto al control. En el grupo de fructosa se observa el mismo comportamiento que en el grupo de NAM10, sin embargo, existe un aumento mayor de las relaciones NADH/NAD (~6 veces) y NADPH/NADP (~11 veces) con respecto al Control. En los grupos de fructosa suplementados con NAM no hay diferencias significativas con respecto al grupo Fructosa.

Tabla 4. Efecto de fructosa y nicotinamida sobre NAD(H) y NADP(H)

	Control	NAM10	Fructosa	F+NAM5	F+NAM10	F+NAM15
NAD (mM)	2.551±0.641	0.392±0.235 ^g	0.454±0.296 ^g	0.400±0.165	0.317±0.098	0.278±0.022
NADH (mM)	0.599±0.334	0.324±0.056	0.870±0.577 ^a	0.486±0.116	0.402±0.078	0.316±0.020
NADH/NAD	0.231±0.112	1.102±0.717 ^a	1.600±0.346 ^g	1.301±0.419	0.861±0.343	1.137±0.017
NADt (mM)	3.140±0.902	0.716±0.181 ^e	1.457±0.970 ^c	0.886±0.238	0.719±0.149	0.594±0.041
NADP (mM)	1.046±0.463	0.172±0.034 ^e	0.192±0.128 ^g	0.158±0.009	0.161±0.036	0.128±0.048
NADPH (mM)	0.156±0.106	0.453±0.052 ^a	0.360±0.146 ^c	0.407±0.053	0.433±0.122	0.267±0.036
NADPH/NADP	0.185±0.154	0.389±0.116 ^a	2.300±1.318 ^a	2.599±0.484	2.907±1.499	2.283±0.727
NADPt (mM)	1.202±0.413	0.625±0.018 ^a	0.551±0.238 ^c	0.565±0.046	0.595±0.091	0.395±0.082

Los valores son expresados como la media ± DE de 5 animales por cada grupo. En a, p<0.05 contra grupo Control; c, p<0.01 contra grupo Control; e, p<0.001 contra grupo Control; g, p<0.0001 contra grupo Control. NAD, Nicotinamida adenina dinucleótido; NADH, NAD reducido; NADt, NAD total; NADP, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADPH, NADP reducido; NADPt, NADP total.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El consumo alto y crónico de fructosa provoca una serie de consecuencias destacando; activación de factores de transcripción y expresión de enzimas glicolíticas y lipogénicas, estrés del retículo endoplásmico, estrés oxidante, que se manifiesta en esteatosis hepática. Los resultados obtenidos del presente estudio demuestran que la ingesta abundante y crónica de fructosa induce la lipogénesis *de novo*; así constatado por ganancia de peso, resistencia a la insulina, aumentos de AGL, TG, Ct, LDL, MDA sérico y disminución de HDL. A nivel hepático se presenta un aumento de actividades y expresión de G6PD y ME, AGH, MDA, GSSG, aumento del estrés reductor, dado por NADH/NAD y NADPH/NADP y decremento de GSH. Todas éstas alteraciones metabólicas y tisulares inducidas por la fructolipototoxicidad fueron abatidas por NAM a las dosis empleadas.

El aporte calórico extra por la ingesta de fructosa indujo un decremento en el consumo de alimento con ganancia de peso, indicativo de alteraciones en las señales de apetito-saciedad. Los estudios relacionados con el consumo de fructosa han demostrado que el carbohidrato induce señales de apetito, sensación de recompensa, disminuyendo señales de saciedad. A nivel de hipotálamo, debido al metabolismo no regulado de fructosa por niveles energéticos, induce una disminución de ATP, lo que activa señales orexigénicas (Luo, Monterosso, Sarpelleh, & Page, 2015). Por otra parte, el hecho de que la fructosa no induzca liberación de insulina, reduce la saciedad y disminuye la sensación de recompensa a nivel cerebral. Por lo tanto, promueve mayor consumo de bebida que de alimento (Luo, Monterosso, Sarpelleh, & Page, 2015). Además, en individuos obesos con resistencia a la insulina después de ingerir fructosa, no muestran disminución en los niveles de ghrelina acilada, lo que perpetúa la señal orexigénica de esta hormona (Van Name, y otros, 2015). De igual manera, la ingesta de altas cantidades de carbohidratos incrementa las concentraciones de ghrelina, disminuyendo las concentraciones de péptido YY en circulación, repercutiendo en un aumento de ganancia de peso en el grupo de Fructosa por pérdida de la respuesta anorexigénica (Lindqvist, Baelemans, & Erlanson, 2008).

El exceso de carbohidrato proveniente de bebidas edulcoradas se transforma en grasa a través de lipogénesis *de novo* (figura 10), presente en hígado, tejido adiposo y glándula mamaria. Con base en los resultados obtenidos como son los incrementos en TG, AGL y AGH, puede aseverarse que existe falla en la β -oxidación, aumento de síntesis de ácidos grasos *de novo* (Crescenzo, y otros, 2013) y aumento de lipólisis a nivel de tejido adiposo (Nassir & Ibdah, 2016), justificando la ganancia de peso en el grupo suplementado con el carbohidrato. Fructosa inhibe la β -oxidación, por una parte, incrementando los niveles de AcetilCoA mitocondrial, donde luego es convertido a malonil-CoA inhibiendo la actividad de carnitina palmitoil transferasa (CPT-1). Alternó a esto, disminuye la expresión de PPAR α (Schultz, Neil, Aguila, & Mandarim-de-Lacerda, 2013) y en consecuencia la expresión de genes involucrados en la β -oxidación (Su, y otros, 2014).

La inducción de la lipogénesis *de novo* se da mediante diversos mecanismos, preferentemente por aumento en la disponibilidad de diversos metabolitos lipogénicos como el piruvato (Hirahatake, Maissen, Fiehn, & Adams, 2011). Una vez internalizado el piruvato en la mitocondria y convertido en AcetilCoA se incorpora al Ciclo de Krebs. Dado el sobreflujo de sustrato en el ciclo, se induce formación del anión superóxido, propiciado por fuga de electrones de la coenzima reducida en presencia del oxígeno molecular, generando estrés oxidante y afectando a la mitocondria, que se traduce en la inhibición de la enzima aconitasa mitocondrial, causando acumulación de citrato (Lanaspa, y otros, 2012). El citrato es transportado hacia el citosol por el acarreador de citrato, cuya actividad se ve incrementada por efecto de insulina (Gnoni, Priore, Geelen, & Siculella, 2009). Debido a la saturación en el Ciclo de Krebs por citrato y NADH, además del sobreflujo de electrones que genera NADH, se induce formación del anión superóxido, propiciado por fuga de electrones de la coenzima reducida en presencia del oxígeno molecular, generando estrés oxidante y afectando a la mitocondria, lo que se traduce en la inhibición de la enzima aconitasa mitocondrial, resultando en la acumulación de citrato (Lanaspa, y otros, 2012). El aumento en la concentración de citrato en citosol estimula la actividad ACL y FAS (Lanaspa, y otros, 2012).

También la estimulación de la lipogénesis *de novo* bajo los efectos de fructosa, se da a nivel transcripcional. El carbohidrato activa a ChREBP mediante modificaciones postraduccionales, entre ellos la O-glucosaminilación (Sakiyama, y otros, 2010), por activación de la vía de las hexosaminas (Hirahatake, Maissen, Fiehn, & Adams, 2011). Otro mecanismo es el incremento de X5P consecuencia de la activación de la vía de las pentosas fosfato, el cual promueve la defosforilación de ChREBP por la fosfatasa PP2A, permitiendo su traslocación al núcleo, heterodimerización con Max like factor (Mlx) y la posterior activación de la transcripción de sus genes diana (Kabashima, Kawaguchi, Wadzinski, & Uyeda, 2003). ChREBP también puede acetilarse en el residuo K672 por la histona acetil transferasa (p300), incrementando su actividad transcripcional (Bricambert, y otros, 2010). Además, p300 *per se* induce la activación de genes lipogénicos mediante un efecto epigenético a través de la acetilación de proteínas histonas y no histonas (Lee, Kim, Friso, & Choi, 2017). La fructosa induce liberación de la enzima glucocinasa de su proteína reguladora (Gckr) (Herman & Samuel, 2016), aumentando G6P y permitiendo tanto la activación de ChREBP (Izuka, 2017) y del complejo MondoA-Mlx. Éste último también contribuye a la expresión de enzimas lipogénicas igual que ChREBP (Havula & Hietakangas, 2012).

La función de ChREBP induce la expresión de enzimas que metabolizan la fructosa, como fructocinasa, aldolasa B (Herman & Samuel, 2016), piruvato cinasa hepática, FAS, ACL y SCD1 (Herman & Samuel, 2016) así como G6PD. De las evidencias nuevas en relación a ChREBP se ha demostrado que induce a las proteínas Spot 14 (S14) y S14-related (S14-R), las cuales incrementan la polimerización de ACC y su consecuente activación para la lipogénesis *de novo* (Havula & Hietakangas, 2012).

Otro de los factores de transcripción inducidos por el consumo crónico de fructosa es la expresión de SREBP1c vía señalización insulina-mTOR, su procesamiento proteolítico y consiguiente activación (Herman & Samuel, 2016). Paralelo a esto, la fosforilación de fructosa, F1P, activa a PGC1 β , el que participa como un coactivador de SREBP1c. También el estrés del retículo endoplásmico causado por fructosa

induce la activación SREBP1c, independiente de insulina (Ferré & Foufelle, 2010). La actividad transcripcional de este factor tiene como genes diana a ACC, ATC, FAS, ME y G6PD, induciendo la activación de lipogénesis *de novo*. Mediante la activación del receptor hepático X (LXR) α se induce la expresión de genes involucrados en el eflujo del colesterol y aclaramiento, y la inducción de SREBP1c para la formación de ésteres de colesterol, así como inducción de la lipogénesis *de novo* (Ferré & Foufelle, 2010). Bajo el efecto del estrés sobre el retículo endoplásmico y acción de UPR se permite el procesamiento proteolítico de SREBP2, lo que activa la síntesis de colesterol (Ferré & Foufelle, 2010). Por todo lo descrito, se justifica la desregulación de lípidos observado en el grupo de Fructosa.

Recientemente se ha dado a conocer que individuos que presentan hiperinsulinemia sin hiperglucemia desarrollan resistencia a la insulina (Yang, y otros, 2016), similar a lo observado en el grupo tratado con fructosa. La resistencia a la insulina observada en el presente estudio es consecuencia de la acumulación de AGH, que interfieren con la señalización de la insulina vía IRS2 (Perry, Samuel, Petersen, & Shulman, 2014) mediante la activación de PKC ϵ por la acumulación intracelular de diacilgliceroles (Gaibo & Shulman, 2013). Además, de la fosforilación del IRS1 en residuos de serina mediado por activación de JNK (Rodríguez, y otros, 2016), IKK α/β -NF- κ B o PKC; así como la defosforilación en residuos de tirosina por PTP1B debido al estrés oxidante (Bettaieb, y otros, 2014) provocado por la fructolipototoxicidad.

La fructosa induce incremento de ROS mediante la actividad y expresión de NADPH oxidasa (Bettaieb, y otros, 2014), formación de AGEs, reducción en la expresión de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (Schalkwijk, Stehouwer, & Van Hinsbergh, 2004), así como un aumento en la relación NADH/NAD que es el principal factor que permite el aumento en la producción de ROS por parte de la mitocondria (Wellen & Thompson, 2010) debido a un desacoplamiento en la cadena de transporte de electrones (Crescenzo, y otros, 2013).

El incremento de ROS induce la resistencia a la insulina, lipoperoxidación de las membranas lipídicas y su alteración contribuyendo a amplificar el daño celular manifestado en generar productos oxidados altamente tóxicos. Esto se relaciona con el aumento de malondialdehído (MDA) en el grupo de Fructosa, donde MDA es un producto final de la lipoperoxidación y es un indicador indirecto del estrés oxidante (Kurutas, 2016). Lo anterior coincide con el decremento en la concentración de GSH y aumento en GSSG en el grupo de Fructosa, el sistema del glutatión es uno de los principales sistemas intracelulares para metabolizar ROS y productos de lipoperoxidación. Además, el aumento de ALT y AST en el grupo de Fructosa evidencia el daño hepático inducido por el tratamiento con el carbohidrato.

El consumo crónico de fructosa promueve desregulación en las coenzimas NAD(H) y NADP(H) favoreciendo el estrés reductor. Estos cambios en las coenzimas por la sobrecarga del consumo constante de fructosa, incrementa la concentración de NADH por el aumento en la actividad de la vía glicolítica y el Ciclo de Krebs, además de falta de reoxidación de la coenzima vía mitocondria. Por otra parte, algunas enzimas que consumen NAD como PARPs y SIRTs. Con ésta apreciación, el aumento de ROS induce daño al DNA (Pang, y otros, 2011), esto activa a PARP para reparar el daño producido por ROS, agotando las concentraciones de NAD (Pang, Xi, Jin, Han, & Zhang, 2013). Esto genera un ciclo vicioso, que por deficiencia de NAD disminuye la producción de ATP, repercutiendo en un mayor agotamiento de NAD (Houtkooper, Cantó, Wanders, & Auwerx, 2010).

La falta de NAD provoca un decremento en la actividad de SIRT1 (Houtkooper, Cantó, Wanders, & Auwerx, 2010) , y, en consecuencia, aumento en la lipogénesis *de novo* y disminución de β -oxidación (Nassir & Ibdah, 2016). Se esperaría que tanto PARP como SIRTs tuvieran actividad baja por falta de NAD, sin embargo, el hecho de que PARP trabaje con una Km baja, contribuye al agotamiento de NAD, no así SIRTs que requieren concentraciones más altas de NAD (Houtkooper, Cantó, Wanders, & Auwerx, 2010).

Otro marcador del estrés reductor en el grupo de Fructosa es el incremento de la relación NADPH/NADP; debido al aumento en la actividad y expresión de G6PD y

ME, así como la actividad de IDP, ante la necesidad celular de mantener las concentraciones altas de NADPH para la síntesis de ácidos grasos *de novo*. La enzima G6PD es regulada por disponibilidad de G6P; obtenido de la dieta, de la activación de la fase no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato y un desajuste en la actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa por aumento en la relación NADH/NAD, ocasionando aumento de gliceraldehído-3-fosfato y generando G6P. Cabe recordar que G6P es un inductor de factores de transcripción para el encendido de la lipogénesis *de novo*. Con ésta apreciación el aumento en la expresión de ChREBP y SREBP1c, incrementa el mRNA, justificando el incremento en la expresión de G6PD. También a través del proceso de empalme donde participa el coactivador factor de empalme 3 rico en arginina y serina (SRSF3) fosforilado, que al ser activado aumenta la eficiencia en la expresión del gen, reflejado en mayor cantidad de mRNA maduro (Walsh, y otros, 2013). Además, la vida media del mRNA de G6PD aumenta de 4-5 veces durante el alto consumo de carbohidratos (Prostko, Fritz, & Kletzien, 1989). Se espera que la relación elevada de NADPH/NADP debiera regular negativamente la actividad de G6PD, sin embargo, no ocurre por lo que se encuentra activa debido a diversos factores. Entre ellos, fosforilación de G6PD vía fosfatidil inositol 3 cinasa y/o Src cinasa a través de un efecto sinérgico de NADPH oxidasa manteniendo la actividad de la enzima (Gupte, y otros, 2009). Otro mecanismo posible es mediante la activación de NmrA-like family domain-containing protein 1 (NMRAL1), el cual captura el NADPH cuando la relación NADPH/NADP es alta, induciendo la actividad de G6PD (Barcia & Ramos, 2014).

En el caso de ME también es regulada por SREBP1c, justificando el aumento en la expresión. Igualmente, pudiera encontrarse fosforilada al igual que ACC y ACL vía señalización de la insulina-proteínas cinasas (Brownsey, Edgell, Hopkirk, & Denton, 1984), ya que ME posee un sitio probable de fosforilación (UniProt, 2017). No obstante, en el grupo de Fructosa no se observaron cambios en cuanto a expresión y actividad de IDP, esta enzima tiene una actividad específica mayor que G6PD y ME.

Uno de los cambios importantes que propició NAM a las diferentes dosis empleadas en los grupos con fructosa, es que se distingue una tendencia a disminuir la relación NADH/NAD sin diferencias significativas. A pesar de que se ha evidenciado que NAM es inhibidor de SIRT1s, cuando existe un aumento en la relación NADH/NAD y disminución en la cantidad de NAD, NAM aumenta la generación de NAD por inducción de la actividad de la enzima NAM fosforibosil transferasa (Namt), y en consecuencia, aumentando la poza de NAD y la actividad de SIRT1 (Yang, y otros, 2014). Se ha reportado que SIRT1 desacetila a PGC1 α y a PPAR α lo que promueve su actividad transcripcional en el hígado y el aumento en la β -oxidación. SIRT1 también desacetila e inhibe a SREBP1c, disminuyendo la transcripción de enzimas de la lipogénesis *de novo* (Rui, 2014) promoviendo la disminución de la ganancia de peso, Tag, Ct y AGH, mejorando la sensibilidad a la insulina, así como el decremento en la expresión de G6PD y ME.

Así también la disponibilidad de NAD pudiera incrementar la actividad de SIRT3, regulador de la β -oxidación, así como de la enzima superóxido dismutasa 2, lo que disminuye ROS (Chiarugi, Dölle, Felici, & Ziegler, 2012). Al disminuir ROS, pudiera disminuir la actividad de cinasas que estén fosforilando a G6PD y disminuyendo su actividad. Así mismo, NAM modula la actividad de G6PD mediante una inhibición mixta no competitiva (Torres, y otros, 2013), lo que podría reducir la actividad de NADPH oxidasa y, por lo tanto, disminuyendo la producción de ROS. y por consiguiente reestableciendo la concentración de GSH, disminuyendo GSSG y MDA.

En los grupos de fructosa suplementados con NAM no se observan cambios en la relación NADPH/NADP, a pesar del decremento en la actividad de ME y G6PD. Esto podría deberse a que la actividad de IDP mantiene la relación, ya que no se afecta por el consumo de NAM. Así mismo, la actividad de IDP es ~6 y ~24 veces más alta que G6PD y ME, respectivamente. Los resultados de GSH y GSSG, así como los resultados en el perfil de lípidos, pudieran indicarnos que el NADPH está siendo ocupado para reestablecer la defensa antioxidante, lo que va en concordancia con la disminución en los valores de MDA. Por lo tanto, NAM en el presente estudio

muestra un efecto hepatoprotector frente a la fructolipototoxicidad, al disminuir la actividad de G6PD frenando la lipogénesis *de novo* y con ello el metabolismo de lípidos, reflejado en una disminución del estrés oxidante

9. CONCLUSIONES

- En la tabla 2 se observa el registro del consumo de alimento, bebida y peso corporal de los animales de experimentación.
- Se determinó el perfil bioquímico de los animales de experimentación (Ct, Tag, HDL, LDL, insulina,) y transaminasas (ALT y AST), además de la determinación de AGL y AGH.
- Se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa. En donde se pudo establecer la diferencia entre los grupos estudiados (Figura11).
- Se llevó a cabo la determinación de actividad específica y expresión de enzimas G6PD, ME e IDP en homogenado de hígado de rata.
- La ingesta de fructosa indujo cambios metabólicos, destacando dislipidemia, resistencia a la insulina y lipoperoxidación, y celulares, como acumulación de ácidos grasos *de novo*, estrés oxidante y aumento de las enzimas generadoras de NADPH, como consecuencia del aumento de la lipogénesis *de novo*.
- El suplemento de NAM en los grupos tratados con fructosa causó decremento en la expresión y actividad de G6PD y ME, y sin cambios en la IDP.
- Bajo los tratamientos de fructosa con y sin NAM, las actividades específicas en orden decreciente son IDP>G6PD>ME.
- El mantenimiento de la relación NADPH/NADP fue utilizado para reestablecer las concentraciones de GSH, disminuyendo la lipoperoxidación.
- Las enzimas G6PD y ME pueden ser un blanco terapéutico para regular la lipogénesis *de novo* en el modelo de estudio.
- La NAM reduce la síntesis de ácidos grasos *de novo*, estrés oxidante y mejora la sensibilidad a la insulina a través de regular la enzima G6PD, indicando que NAM es una alternativa de tratamiento para frenar el desarrollo de la obesidad debido al excesivo consumo de fructosa.

10.PERSPECTIVAS

- Dado que se ha observado el efecto de la fosforilación sobre G6PD, es necesario comprobar si en el modelo de estudio la enzima, así como ME, efectivamente presentan éste tipo de modificación.
- Se conoce que SIRT1 es importante para la regulación de la lipogénesis *de novo*, por lo que sería importante la determinación de la actividad y expresión de ésta proteína en el modelo de estudio.
- Debido al efecto benéfico de NAM frente a la lipogénesis *de novo* en el modelo murino, se propone el uso de la vitamina como tratamiento experimental y determinar sus efectos en humano frente a padecimientos como obesidad y esteatosis hepática.

11. REFERENCIAS

- Agledal, L., Niere, M., & Ziegler, M. (2010). The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP. *Redox Report*, 15(1), 2-10.
- Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., & Zaidi, N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism Clinical and Experimental*, 895-901.
- Barcia, R., & Ramos, J. (2014). The regulation of the oxidation phase of the pentose phosphate pathway: new answers to old problems. *IUBMB Life*, 66(11), 775-779.
- Batterham, R., Cowley, M., Small, C., Herzog, H., Cohen, M., Dakin, C., . . . Bloom, S. (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*, 418, 650-654.
- Belenky, P., Bogan, K., & Brenner, C. (2006). NAD metabolism in health and disease. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 32(1), 11-19.
- Bettaieb, A., Vazquez, M., Rodriguez, C., Miatelio, R., Haj, F., Fraga, C., & Oteiza, P. (2014). (-)-Epichatechin mitigates high fructose-associated insulin resistance by modulating redox signaling and endoplasmic reticulum stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 72, 247-256.
- Bray, G. (2013). Energy and fructose from beverages sweetened with sugar or high-fructose corn syrup pose a health risk for some people. *Advances in Nutrition*, 4(2), 220-225.
- Bricambert, J., Miranda, J., Benhamed, F., Girard, J., Postic, C., & Dentin, R. (2010). Salt inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(12), 4316-4331.
- Brownsey, R., Edgell, N., Hopkirk, T., & Denton, R. (1984). Studies on insulin-stimulated phosphorylation of Acetyl-CoA carboxylase, ATP citrate lyase and other proteins in rat epididymal adipose tissue. *Biochemical Journal*, 218, 733-743.
- Cappellini, M., & Fiorelli, G. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*, 371, 64-74.
- CEVECE. (2014). *Alto Consumo de Refrescos en Hogares Mexicanos*. Recuperado el 11 de Febrero de 2017, de Centro Estatal de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades: http://salud.edomex.gob.mx/cevece/documentos/documentostec/documentos/Refrescos_hogarmx.pdf

- Chiarugi, A., Dölle, C., Felici, R., & Ziegler, M. (2012). The NAD metabolome - a key determinant of cancer cell biology. *Nature Reviews Cancer*, 12, 741-752.
- Crescenzo, R., Bianco, F., Falcone, I., Coppola, P., Liverini, G., & Iossa, S. (2013). Increased hepatic de novo lipogenesis and mitochondrial efficiency in a model of obesity induced by diets rich in fructose. *European Journal of Nutrition*, 537-545.
- DeBosch, B., Chen, Z., Saben, J., Finck, B., & Moley, K. (2014). Glucose Transporter 8 (GLUT8) Mediates Fructose-induced de Novo Lipogenesis and Macrosteatosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 10989-10998.
- Druce, M., & Bloom, S. (2006). The regulation of appetite. *Archives of Disease in Childhood*, 91, 183-187.
- Duffey, K., & Popkin, B. (2007). Shifts in Patterns and Consumption of Beverages Between 1965 and 2002. *Obesity*, 15, 2739-2747.
- Feinman, R., & Fine, E. (2013). Fructose in perspective. *Nutrition Metabolism*, 1-11.
- Ferré, P., & Fofelle, F. (2010). Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 12, 83-92.
- Friedman, J., & Halaas, J. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704), 763-770.
- Gaibo, T., & Shulman, G. (2013). Lipid-induced hepatic insulin resistance. *AGING*, 5(8), 580-585.
- Geisbrecht, B., & Gould, S. (1999). The Human PICD Gene Encodes a Cytoplasmic and Peroxisomal NADP⁺-dependent Isocitrate Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(43), 30527-30533.
- Gil, A. (2015). *Tratado de Nutrición* (Vol. I). Madrid, España: Médica Panamericana.
- Girard, J., Ferré, P., & Fofelle, F. (1997). Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annual Reviews of Nutrition*, 325352.
- Gnoni, G., Priore, P., Geelen, M., & Siculella, L. (2009). The Mitochondrial Citrate Carrier: Metabolic Role and Regulation of its Activity and Expression. *IUBMB Life*, 61(10), 987-994.
- Gupte, R., Floyd, B., Kozicky, M., George, S., Ungvari, Z., Neito, V., . . . Gupte, S. (2009). Synergistic Activation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and

NAD(P)H oxidase by Src kinase Elevates Superoxide in Type 2 Diabetic, Zucker fa/fa, Rat Liver. *Free radical Biology and Medicine*, 47(3), 219-228.

- Gutiérrez J., R. J. (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales*. Instituto Nacional de Salud Pública. Recuperado el 2017 de Mayo de 20, de ENSANUT: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
- Havula, E., & Hietakangas, V. (2012). Glucose sensing by ChREBP/MondoA-Mlx transcription factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23, 640-647.
- Hellerstein, M. (1999). De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(5), 553-565.
- Herman, M., & Samuel, V. (2016). The Sweet Path to Metabolic Demise: Fructose and Lipid Synthesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(10), 719-730.
- Hirahatake, K., Maissen, J., Fiehn, O., & Adams, S. (2011). Comparative Effects of Fructose and Glucose on Lipogenic Gene Expression and Intermediary Metabolism in HepG2 Liver Cells. *PLoS ONE*, 6(11), 1-9.
- Houtkooper, R., Cantó, C., Wanders, R., & Auwerx, J. (2010). The Secret of NAD: An Old Metabolite Controlling New Metabolic Signaling Pathways. *Endocrine Reviews*, 31(2), 194-223.
- Izuka, K. (2017). The Role of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Intestinal and Hepatic Fructose Metabolism. *Nutrients*, 9(2), 181-193.
- Jentzch, A., Bachmann, H., Fürst, P., & Biesalski, H. (1996). Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(2), 251-256.
- Kabashima, T., Kawaguchi, T., Wadzinski, B., & Uyeda, K. (2003). Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), 5107-5112.
- Kolderup, A., & Svihus, B. (2015). Fructose metabolism and relation to atherosclerosis, type 2 diabetes, and obesity. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2015, 1-12.
- Kurutas, E. (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress:current state. *Nutrition Journal*, 15(1), 15-93.
- Laliotis, G., Bizelis, I., & Rogdakis, E. (2010). Comparative approach of the novo fatty acid synthesis (Lipogenesis) between ruminant and non ruminant

mammalian species: from biochemical level to the main regulatory lipogenic genes. *Current Genomics*, 168-183.

- Lanaspa, M., Sanchez, L., Choi, Y., Cicerchi, C., Kanbay, M., Roncal, C., . . . Johnson, R. (2012). Uric Acid Induces Hepatic Steatosis by Generation of Mitochondrial Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40732-40744.
- Lee, J., Kim, Y., Friso, S., & Choi, S. (2017). Epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 54, 78-88.
- Lindqvist, A., Baelemans, A., & Erlanson, C. (2008). Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regulatory Peptides*, 150, 26-32.
- Liu, L., Fu, C., & Li, F. (2016). Dietary Niacin Supplementation Supressed Hepatic Lipid Accumulation in Rabbits. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*.
- López, M., & Rodríguez, M. (2008). Epidemiología y genética del sobrepeso y la obesidad. Perspectiva de México en el contexto mundial. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 65, 421-430.
- Luo, S., Monterosso, J., Sarpelleh, K., & Page, K. (2015). Differential effects of fructose versus glucose on brain and appetitive responses to food cues and decisions for food rewards. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(20), 6509-6514.
- Malik, V., Schulze, M., & Hu, F. (2006). Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84(2), 274-288.
- Min, S., Koh, H., Park, D., Song, B., Huh, T., & Park, J. (2002). Cytosolic NADP-dependent Isocitrate Dehydrogenase Status Modulates Oxidative Damage to Cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(11), 1185-1196.
- Nakamura, M., Bhatnagar, A., & Sadoshima, J. (2011). Overview of Pyridine Nucleotides Review Series. *Circulation Research*, 604-610.
- Nassir, F., & Ibdah, J. (2016). Sirtuins and nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 22(46), 10084-10092.
- National Center for Biotechnology Information. (2015). *D(-)-Fructose*. Recuperado el 21 de Diciembre de 2015, de PubChem Compound Database: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5984#section=2D-Structure>
- OMIM. (2013). *Malic Enzyme 1; ME1*. Recuperado el 8 de Septiembre de 2016, de OMIM:

<http://www.omim.org/entry/154250?search=malic%20enzyme&highlight=enzyme%20enzymatic%20malic>

- Organización Mundial de la Salud. (2015). *Obesidad y sobrepeso*. Recuperado el Enero de Diciembre de 2015, de Centro de prensa: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Pang, J., Gong, H., Xi, C., Fan, W., Dai, Y., & Zhang, T. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase1 is involved in glucose toxicity through SIRT1 modulation in HepG2 hepatocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(1), 299-306.
- Pang, J., Xi, C., Jin, J., Han, Y., & Zhang, T. (2013). Relative Quantitative Comparison between Lipotoxicity and Glucotoxicity Affecting the PARP-NAD-SIRT1 Pathway in Hepatocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 32, 719-727.
- Papagrigoriou, E., Berridge, G., Smee, C., Bray, J., Arrowsmith, C., Edwards, A., . . . von Delft, F. (20 de Septiembre de 2005). *2AW5 Crystal structure of a human malic enzyme*. Obtenido de Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2AW5>
- Perry, R., Samuel, V., Petersen, K., & Shulman, G. (2014). The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 510(7503), 84-91.
- Petrack, B., Greengard, P., & Kalinsky, H. (1966). On the Relative Efficacy of Nicotinamide and Nicotinic Acid as Precursors of Nicotinamide Adenine Dinucleotide. *The Journal of Biological Chemistry*, 241(10), 2367-2372.
- Prostko, C., Fritz, R., & Kletzien, R. (1989). Nutritional regulation of hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 258, 295-299.
- Rodríguez, C., Perdicaro, D., Antonioli, A., Fontana, A., Miatello, R., Bottini, R., & Vazquez, M. (2016). Grape pomace and grape pomace extract improve insulin signaling in high-fat-fructose fed rat-induced metabolic syndrome. *Food and function*, 7(3), 1544-1553.
- Rolfe, H. (2014). A review of nicotinamide: treatment of skin diseases and potential side effects. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 13(4), 324-328.
- Rui, L. (2014). Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177-197.
- Sakiyama, H., Fujiwara, N., Noguchi, T., Eguchi, H., Yoshibara, D., Uyeda, K., & Suzuki, K. (2010). The role of the O-linked GlcNAc modification on the glucose response of ChREBP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402, 784-789.

- Schalkwijk, C., Stehouwer, C., & Van Hinsbergh, V. (2004). Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coping or bad modification. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 20, 369-382.
- Schultz, A., Neil, D., Aguila, M., & Mandarim-de-Lacerda, C. (2013). Hepatic Adverse Effects of Fructose Consumption Independent of Overweight/Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 21873-21886.
- Secretaria de Salud del Distrito Federal. (2015). *Sobrepeso y Obesidad*. Recuperado el 10 de Diciembre de 2015, de No a la Obesidad: http://www.noalaobesidad.df.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=44&Itemid=59
- Shechter, I., Dai, P., Huo, L., & Guan, G. (2003). IDH1 gene transcription is sterol regulated and activated by SREBP-1A and SREBP-2 in human hepatoma HepG2 cells: evidence that IDH1 may regulate lipogenesis in hepatic cells. *Journal of Lipid Research*, 44, 2169-2180.
- Shibata, K., Fukuwatari, T., & Suzuki, C. (2014). Pharmacological Doses of Nicotinic Acid and Nicotinamide are Independently Metabolized in Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 60, 86-93.
- Shimano, H. (2001). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Progress in Lipid Research*, 439-452.
- Softic, S. C. (2016). Role of dietary fructose and hepatic de novo lipogenesis in fatty liver disease. *Digestive Disease & Science*, 1282-1293.
- Stanton, R. (2012). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival. *IUBMB Life*, 64(5), 362-369.
- 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-E1273.
- Tappy, L., Lê, K., Tran, C., & Paquot, N. (2010). Fructose and metabolic diseases: New findings, new questions. *Nutrition*, 26, 1044-1049.
- Tietze, F., F. (1969). Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. *Analytical Biochemistry*, 27, 502-522.
- Torres, N., Baiza, L., García, R., Ortega, C., Contreras, A., Medina, R., . . . Díaz, M. (2013). Nicotinamide, a glucose-6-phosphate dehydrogenase non-

- competitive mixed inhibitor, modifies redox balance and lipid accumulation in 3T3-L1 cells. *Life Sciences*, 975-985.
- Uldry, M., & Thorens, B. (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *European Journal of Physiology*, 480-489.
- UniProt. (15 de Marzo de 2017). *UniProtKB-P13697 (MAOX_RAT)*. Obtenido de UniProt: <http://www.uniprot.org/uniprot/P13697>
- Uyeda, K., Yamashita, H., & Kawaguchi, T. (2002). Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochemical Pharmacology*, 2075-2080.
- Van Name, M., Giannini, C., Santoro, N., Jastreboff, A., Kubat, J., Li, F., . . . Caprio, S. (2015). Blunted Suppression of Acyl-Ghrelin in Response to Fructose Ingestion in Obese Adolescents: The Role of Insulin Resistance. *Obesity*, 23(3), 653-661.
- Walsh, C., A., S., Cyphert, T., Kohan, A., Szeszel-Fedorowicz, W., & Salati, L. (2013). Serine Arginine Splicing Factor 3 is Involved in Enhanced Splicing of Glucose-6-phosphate dehydrogenase RNA in Response to Nutrients and Hormones in Liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(4), 2816-2828.
- Wellen, K., & Thompson, C. (2010). Cellular Metabolic Stress: Considering How Cells Respond to Nutrient Excess. *Molecular Cell*, 40, 323-332.
- Wren, A., Small, C., Abott, C., Dhillon, W., Seal, L., Cohen, M., . . . Bloom, S. (2001). Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes*, 50(11), 2540-2547.
- Xu, X., Zhao, J., Peng, B., Huang, Q., Arnold, E., & Ding, J. (15 de Junio de 2004). *1T09 Crystal structure of human cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase in complex NADP*. Obtenido de Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1T09>
- Yang, G., Li, C., Gong, Y., Fang, F., Tian, H., Li, J., & Cheng, X. (2016). Assessment of Insulin Resistance in Subjects with Normal Glucose Tolerance, Hyperinsulinemia with Normal Blood Glucose Tolerance, Impaired Glucose Tolerance, and Newly Diagnosed Type 2 Diabetes (Prediabetes Insulin Resistance Research). *Journal of Diabetes Research*, 2016, 11.
- Yang, S., Choi, J., Kim, L., Park, S., Rhee, E., Lee, W., . . . Park, C. (2014). Nicotinamide improves glucose metabolism and affects the hepatic NAD-sirtuin pathway in a rodent model of obesity and type 2 diabetes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25, 66-72.

- Yañez, M., Soriguer, F., Villar, J., & Pachon, J. (1975). *Dislipidemias, lipoidosis, lipodistrofias y obesidad*. Sevilla: Publicaciones de la Universidad de Sevilla.
- Zelewski, M., & Swierczynski, J. (1991). Malic enzyme in human liver: Intracellular distribution, purification and properties of cytosolic isozyme. *European Journal of Biochemistry*, 339-345.

12. ANEXOS

- Curva de cuantificación de ácidos grasos

Tabla 5. Tabla de concentraciones y valores de absorbancia de la curva para la determinación de ácidos grasos

Solución	Concentración (nmol/ μ L)	Absorbancia
Estándar Cero	0	0.050
A	2	0.464
B	4	0.582
C	6	0.710
D	8	0.899
E	10	1.113

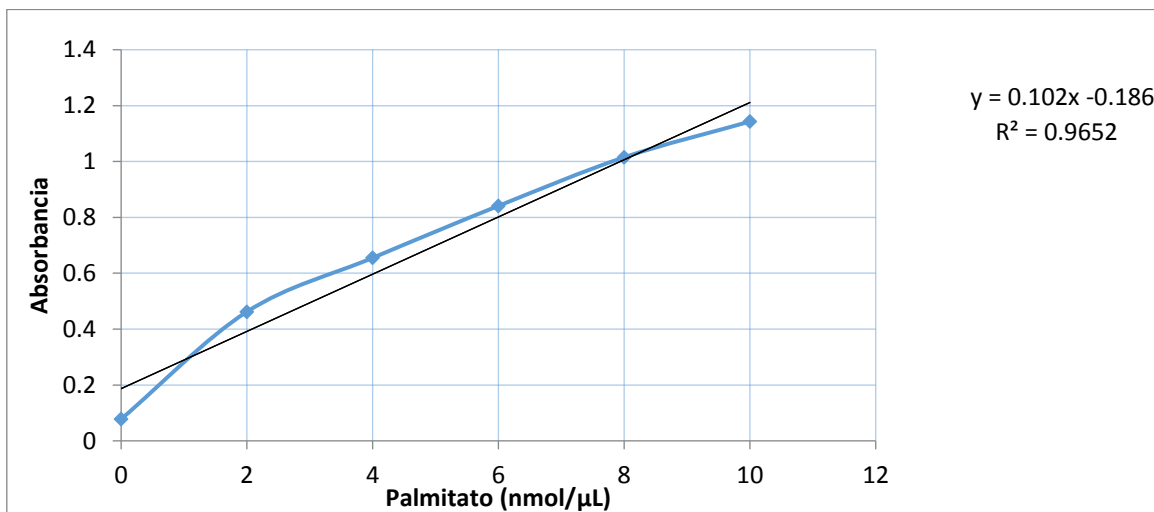


Figura 17. Curva de cuantificación para la determinación de ácidos grasos.

- Curva de cuantificación de insulina

Tabla 6. Tabla de concentraciones y valores de absorbancia de la curva para la cuantificación de insulina sérica.

Solución	Concentración (ng/mL)	Absorbancia
Estándar Cero	0	0.053
A	0.15	0.081
B	0.40	0.113
C	1.00	0.237
D	3.00	1.096
E	5.50	2.430

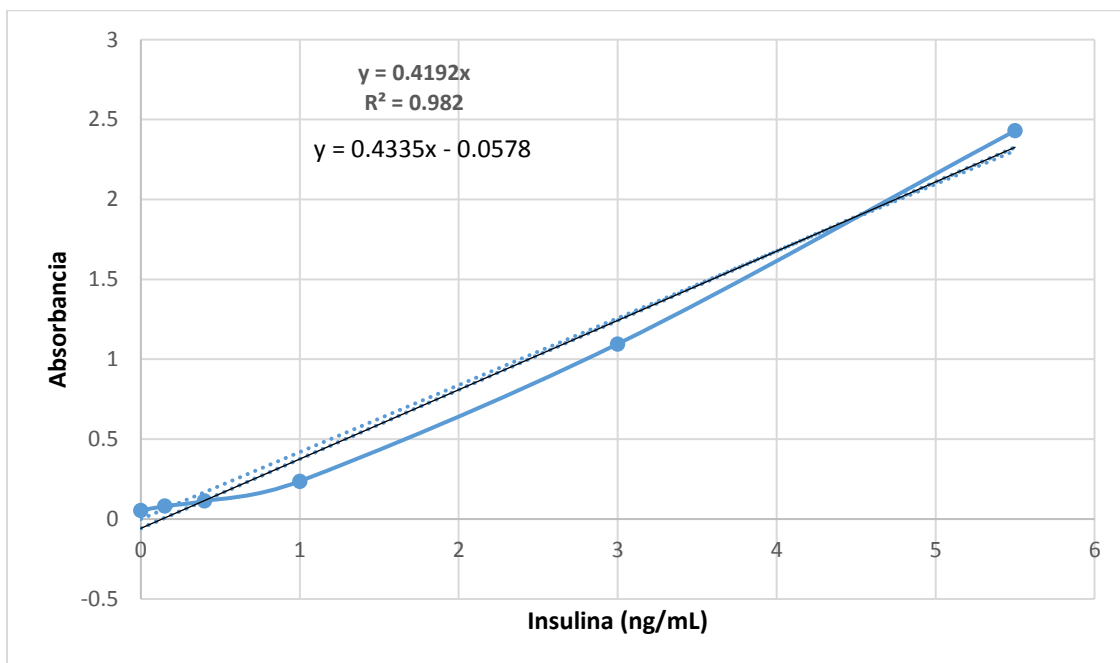


Figura 18. Curva de cuantificación para la determinación de insulina sérica.

- Curva de cuantificación de GSH

Tabla 7. Tabla de concentraciones y valores de absorbancia de la curva para la cuantificación de glutatión.

Solución	Concentración (μM)	Absorbancia
0	0	0.000
1	10	0.060
2	20	0.090
3	40	0.157
4	60	0.211
5	80	0.269
6	100	0.324

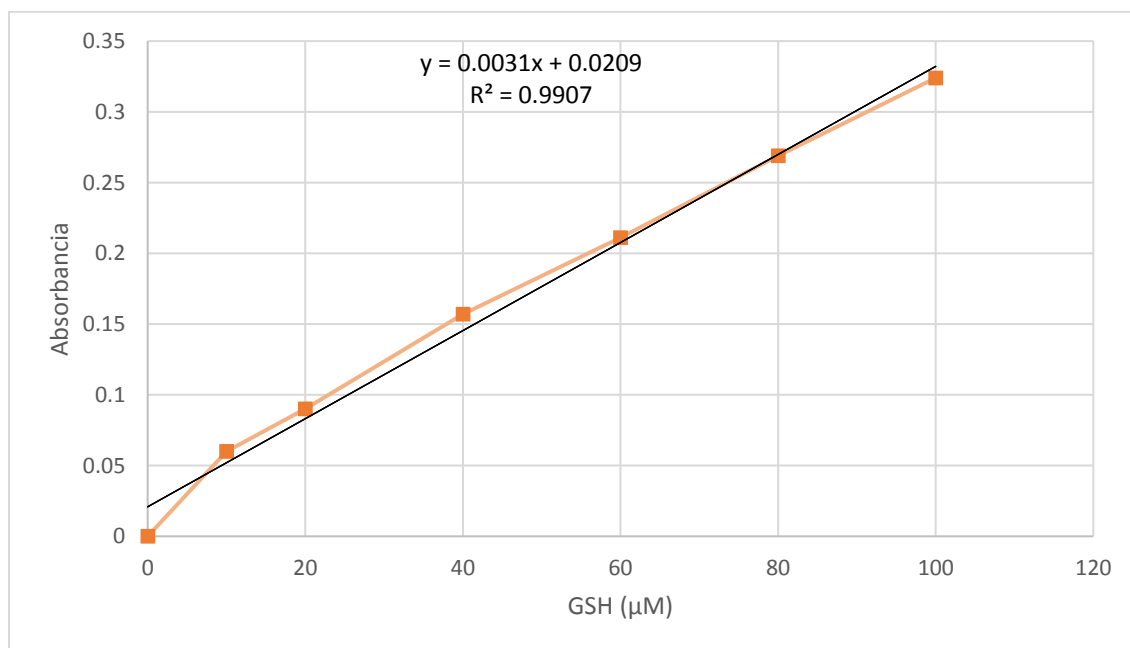


Figura 19. Curva de cuantificación para la determinación de glutatión.

- Curva de cuantificación de MDA

Tabla 8. Tabla de concentraciones y valores de absorbancia de la curva para la cuantificación de MDA.

Solución	MDA (nmol)	Absorbancia
0	0	0.054
1	0.5	0.158
2	1	0.280
3	2	0.488
4	3	0.644
5	4	0.896

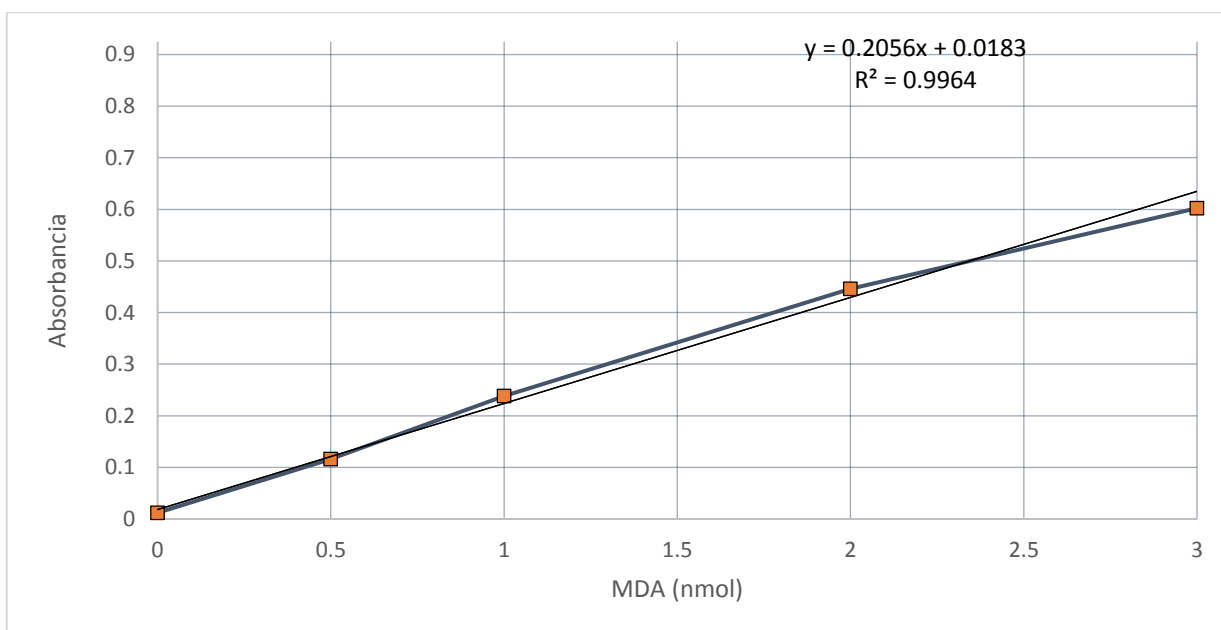


Figura 20. Curva de cuantificación para la determinación de malondialdehído.

- Curva de cuantificación de proteínas.

Tabla 9. Tabla de concentraciones y valores de absorbancia de la curva para la cuantificación de proteínas.

Solución	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia
0	0	0.000
1	125	0.087
2	250	0.133
3	500	0.237
4	750	0.400
5	1000	0.511
6	1500	0.661
7	2000	0.771

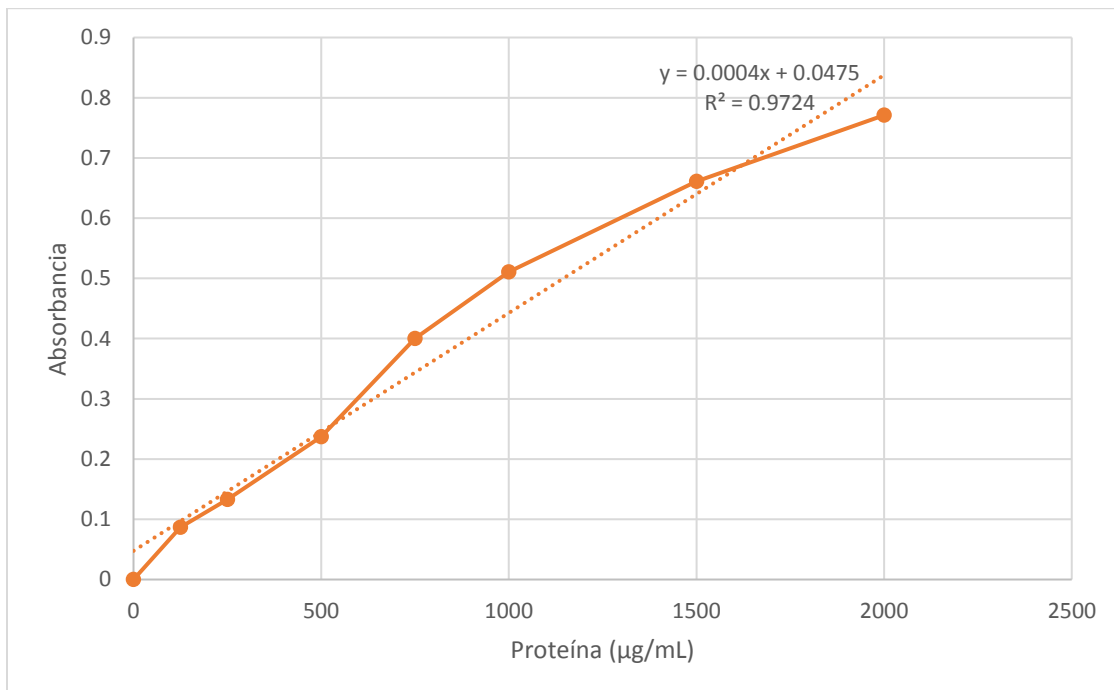


Figura 21. Curva de cuantificación para la determinación de proteína.

- Curva de cuantificación de NADPH

Tabla 10. Tabla de concentraciones y valores de absorbancia de la curva para la cuantificación de NADP(H).

Solución	NADPH (pmol por pocillo)	Absorbancia
0	0	0.000
1	20	0.278
2	40	0.664
3	60	0.863
4	80	1.279

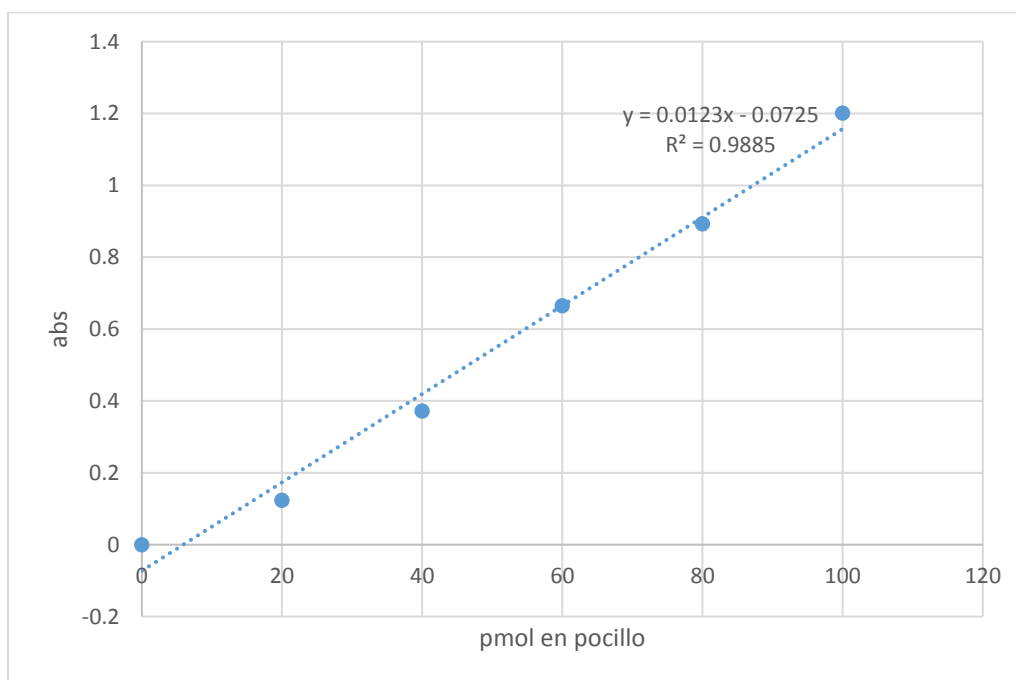


Figura 22. Curva de cuantificación para la determinación de NADPH.

- Curva de cuantificación de NADH

Tabla 11. Tabla de concentraciones y valores de absorbancia de la curva para la cuantificación de NAD(H).

Solución	NADH (pmol por pocillo)	Absorbancia
0	0	0.000
1	20	0.123
2	40	0.372
3	60	0.665
4	80	0.893
5	100	1.201

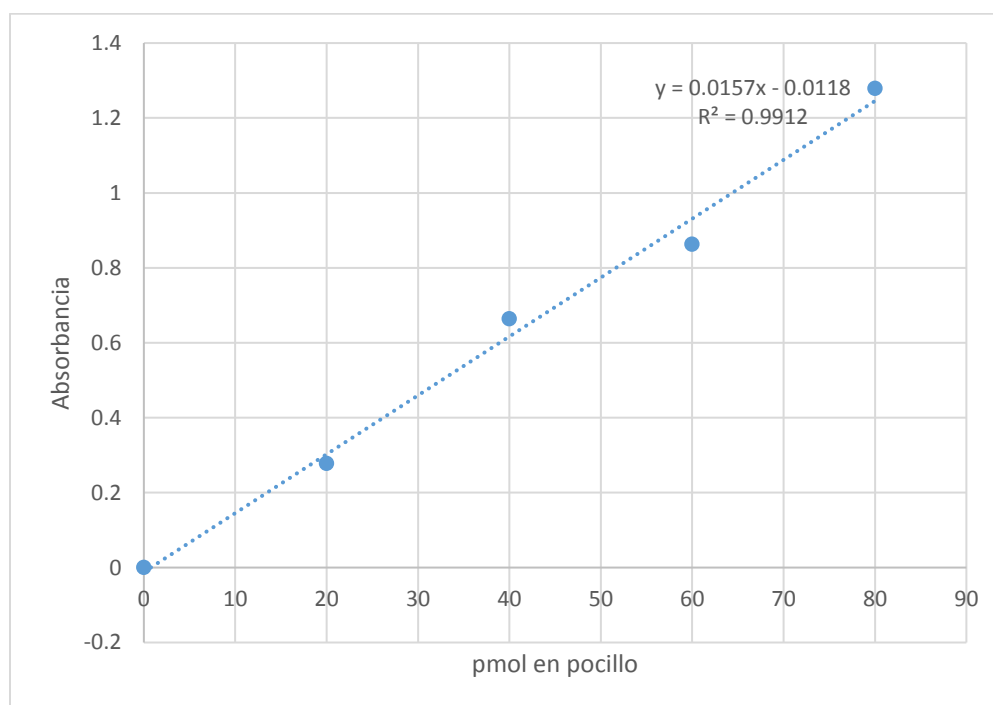


Figura 23. Curva de cuantificación para la determinación de NADH.

- Resultado de la electroforesis para verificar integridad del RNA extraído

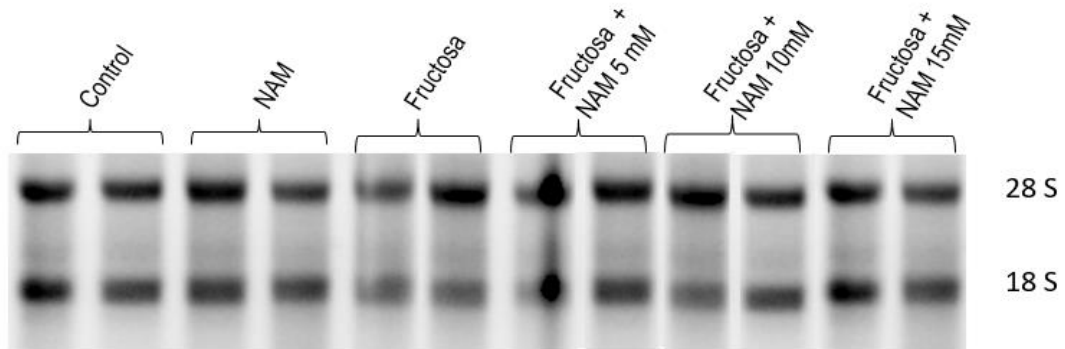


Figura 24. Resultado de la electroforesis para verificar integridad del RNA extraído.

- Tabla de características de los iniciadores

Tabla 12. Tabla de características de los iniciadores usados para la qPCR

#	Nombre de secuencia	Secuencia de 5' a 3'	nt	Peso molecular	%GC	Tm
1 F	G6PD (rata)	CTGGAACCGCATCATAGTGGAG	22	6784.5	54.5	64.5
2 R	G6PD (rata)	CCTGATGATCCCAAATTCATCAAATAG	28	8524.7	35.7	61.7
3 F	IDP (rata)	GCTTCATCTGGGCCTGTAAG	20	6124	55	62.4
4 R	IDP (rata)	ATTGGTGGACGTCTCCTGTC	20	6115	55	62.4
5 F	ME (rata)	TCAGTTGCCTGACTCGATTG	20	6099	50	60.4
6 R	ME (rata)	CTGTCGTCTTTGAGGGCTTC	20	6106	55	62.4
7 F	18S (rata)	ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG	20	6170.1	50	60.4
8 R	18S (rata)	CGCTGAGCCAGTTCAGTGTA	20	6133	55	62.4