



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LOS ACIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS
SOBRE LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO
POR ALTO CONSUMO DE SACAROSA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

SILVIA DEL CARMEN CARRILLO SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER

MÉXICO, D. F.

SEPTIEMBRE, 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas** por ser una excelente casa de estudios mi sincero reconocimiento y agradecimiento.

Mi sincero agradecimiento a **CONACYT** por otorgarme beca durante un semestre. Además agradezco al proyecto **CONACYT** No. 43229-M, por su apoyo para financiar esta tesis de maestría.

Mi sincero agradecimiento a los miembros de mi comité tutorial por sus comentarios, apoyo y paciencia que me brindaron durante la realización de este proyecto:

Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza

Dr. Guillermo C. Cardoso Saldaña

Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder

Al Dr. Mohammed El Hafidi mi sincero agradecimiento por sus enseñanzas, su dirección, apoyo y paciencia que me ha brindado siempre.

A la Dra. Guadalupe Baños de Mac Carthy por su dirección, apoyo y amistad mi sincero agradecimiento.

Al Dr. Felipe Masso mi sincero agradecimiento por su asesoría y por darme las facilidades para trabajar con el equipo de FACS en el laboratorio de Biología Celular (INCICH), también les agradezco su apoyo, atención, y amistad que me han brindado: Araceli Paez, Estrella Zapata, Emma Rodríguez, Elvira Varela, Noé Alvarado, Rebeca Marure.

A mis amigos que siempre me han apoyado Karla, Conchita, Oralia, Dr. Silveira, Eduardo, Sr. Fernando, Julieta y Juan Carlos.

A mi hija Sofía que es lo mejor que me pudo haber pasado en la vida y a Nacho por estar a mi lado, los amo.

A mi familia les agradezco infinitamente por estar siempre conmigo.

Al Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

Al Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM.

GRACIAS

CONTENIDO

ABREVIATURAS	14
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. SÍNDROME METABÓLICO.	16
1.1.1. SÍNDROME METABÓLICO SEGÚN LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS, AÑO 1998)	17
1.1.2. SÍNDROME METABÓLICO SEGÚN <i>NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM</i> (NCEP, AÑO 2001).	18
1.1.3. SÍNDROME METABÓLICO SEGÚN LA ASOCIACIÓN AMERICANA DE ENDOCRINÓLOGOS CLÍNICOS (AAEC, AÑO 2002).	19
1.2. FISIOPATOLOGÍA DEL SÍNDROME METABÓLICO.	20
1.2.2. FACTORES GENÉTICOS.	20
1.3. ALGUNOS COMPONENTES IMPORTANTES DEL SÍNDROME METABÓLICO	22
1.3.1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL (HTA)	23
1.3.2. OBESIDAD ABDOMINAL	25

1.3.3. DISLIPIDEMIA	27
1.3.4. RESISTENCIA A LA INSULINA (RI)	29
1.4. OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA.	30
1.5. ÁCIDOS GRASOS NO-ESTERIFICADOS (AGNE).	31
1.5.1. NOMENCLATURA DE LOS AGNE.	31
1.5.2. PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS DE LOS AGNE	32
1.5.3. MOVILIZACIÓN DE LOS AGNE DEL TEJIDO ADIPOSO.	33
1.5.4. TRANSPORTE DE LOS AGNE	35
1.5.4.1. TRANSPORTE PASIVO	35
1.5.4.2. TRANSPORTE ACTIVO.	37
1.5.5. PAPEL DE LOS AGNE EN LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA	
1.5.6. METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS	38
1.5.6.1. BETA-OXIDACIÓN	39
1.5.7. AGNE Y ENFERMEDADES.	40
1.6. BIOQUÍMICA DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA	41

1.6.1. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA.	41
1.6.1.1. BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LA INSULINA.	42
1.6.2. RECEPTOR DE INSULINA	42
1.6.3. SUSTRATO RECEPTOR DE INSULINA (IRS).	43
1.6.4. EL PAPEL DE LA FOSFATIDILINOSITOL 3-CINASA (PI-3 CINASA) EN LA ACCIÓN DE LA INSULINA.	45
1.6.5. TRANSPORTADORES DE GLUCOSA.	45
1.6.6. TIROSINAS FOSFATASAS.	47
1.7. AGNE Y RESISTENCIA A LA INSULINA.	47
1.8. AGNE Y ESTRÉS OXIDATIVO.	52
1.8.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO).	53
1.8.2. ANTIOXIDANTES FISIOLÓGICOS.	55
1.8.3. ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS:	56
1.8.3.1. BUTIL-HIDROXI-TOLUENO (BHT).	56
1.8.3.2. N-TER-BUTIL-A-FENILNITRONA (PBN).	56

1.8.3.3. N-ACETIL CISTEÍNA (NAC).	56
1.9. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES DEL MODELO ANIMAL CON SÍNDROME METABÓLICO (SM).	57
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	59
3. HIPÓTESIS	60
4. OBJETIVO GENERAL.	60
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES:	60
5. METODOLOGÍA	61
5.1. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES.	61
5.2. DETECCIÓN DE RESISTENCIA A LA INSULINA (PINZA EUGLICÉMICA-HIPERINSULINÉMICA.	61
5.3. OBTENCIÓN DE PLASMA.	62
5.3.1. DETERMINACIÓN DE TRIACILGLICEROLES E INSULINA EN PLASMA.	63
5.3.2. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS EN PLASMA E HÍGADO.	63

5.4. OBTENCIÓN DE HOMOGENEIZADO DE HÍGADO.	65
5.4.1. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE FOSFORILACIÓN DE IR- β E IRS-1 POR INMUNOPRECIPITACIÓN Y ELECTROFORESIS.	66
5.4.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.	68
5.5. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS.	68
5.5.1. INCORPORACIÓN INTRACELULAR DEL DCF-DA EN HEPATOCITOS.	70
5.5.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN HEPATOCITOS.	71
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.	72
6. RESULTADOS	73
6.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES.	73
6.2. PINZA HIPERINSULINÉMICA-EUGLICÉMICA	73
6.3. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS.	74
6.4 CUANTIFICACIÓN BASAL DEL RECEPTOR DE INSULINA (IR- β) Y DEL SUSTRATO RECEPTOR DE INSULINA-1 (IRS-1) EN HOMOGENEIZADO DE HÍGADO.	77

6.5. FOSFORILACIÓN DE TIROSINAS EN IR- β E IRS-1.	78
6.5.1. FOSFORILACIÓN DEL IR- β .	79
6.5.2. FOSFORILACIÓN DEL IRS-1	80
6.6. EFECTO DEL ÁCIDO OLEICO SOBRE LA GENERACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATAS CONTROL Y RATAS SM	82
6.7. EFECTO DEL CLORURO DE DIFENILENIODONIO (DPI) SOBRE LA GENERACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR EL ÁCIDO OLEICO EN HEPATOCITOS AISLADOS.	84
7. DISCUSIÓN	89
8. CONCLUSIONES	98
9. BIBLIOGRAFÍA.	99

ABREVIATURAS

AAEC	Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos
AG	Ácidos Grasos
AGL	Ácidos Grasos Libres
AGNE	Ácidos Grasos No Esterificados
AO	Ácido Oleico
ATP	Adenosin trifosfato
ATP III	Adult Treatment Panel III
BHT	Butil-Hidroxi-Tolueno
BSA	Albúmina bovina libre de ácidos grasos
CPT-1	Carnitina Palmitoil Transferasa-1
DAG	Diacilglicerol
DCF-DA	Diacetato de 2',7' diclorodihidrofluoresceína
DMNID	Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPI	Cloruro de difenileniodonio
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FAS	Sintasa de Ácidos Grasos
FNT-α	Factor de Necrosis Tumoral-α
GSH	Glutación
HDL	Lipoproteínas de alta Densidad
HTA	Hipertensión Arterial
IL6	Interleucina 6

IRS-1	Sustrato 1 del Receptor de Insulina
IR-β	Receptor de Insulina subunidad β
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
LHS	Lipasa Hormono-Sensible
LPK	Piruvato Cinasa en Hígado
LPL	Lipoproteína Lipasa
NAC	N-Acetil Cisteína
NADPH	Dinucleótido de adenina y niacina fosfato reducido
NCEP	National Cholesterol Education Program
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI	Inhibidor del Activador del Plasminógeno
PBN	N-Ter-Butil-α-Fenilnitrona
PI	Fosfoinositol
PKB	Proteína cinasa B
PKC	Proteína cinasa C
PPAR	Receptor Activado por Proliferadores Peroxisomales
RI	Resistencia a la Insulina
RMI	Resonancia magnética
SH	Grupo sulfhidrilo
SM	Síndrome Metabólico
TAC	Tomografía Axial Computarizada
TG	Triglicéridos
UCP-2	Proteína desacoplante 2
VLDL	Lipoproteínas de muy Baja Densidad

RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) es una patología heterogénea cuyas manifestaciones clínicas incluyen la dislipidemia, la obesidad abdominal, la resistencia a la insulina y la hipertensión; estos factores aumentan el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo II y diversas enfermedades cardiovasculares. La resistencia a la insulina (RI) es un denominador común y el nexo con el resto de las manifestaciones. La RI tiene una estrecha relación con la obesidad y el aumento en el plasma de ácido grasos no esterificados (AGNE). El mecanismo por el cual los AGNE reducen la sensibilidad de la insulina no está del todo esclarecido. El objetivo de este trabajo es elucidar el mecanismo por el cual los AGNE inducen resistencia a la insulina en un modelo de síndrome metabólico.

En este trabajo se observaron diferencias significativas de AGNE totales entre el grupo control y el grupo con SM, tanto en el plasma y en el hígado. El análisis de la composición de los AGNE muestra que el ácido oleico (AO) aumentó de manera significativa en el plasma (0.15 ± 0.02 vs. SM 0.32 ± 0.06 mM) y en el hígado (11.1 ± 6.5 vs SM 32.1 ± 8.5 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína, $p < 0.001$). El análisis por Western blot de las cantidades totales de IR- β e IRS-1 en las muestras de homogeneizado de hígado no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos. En cuanto a la fosforilación de estas proteínas, el análisis del IR- β muestra un menor grado de fosforilación en el grupo SM con respecto al grupo control *in vivo*. En presencia de AO la fosforilación del IR- β disminuye significativamente tanto en ratas control como con SM. El tratamiento con 1 μM del antioxidante N-acetil-cisteína (NAC) antes de administrar AO (60 μM) normalizó el grado de

fosforilación del IR- β . En cuanto a la fosforilación de IRS-1, no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos.

La incubación de los hepatocitos marcados con DCF-DA con AO a diferentes concentraciones mostró un aumento dosis-dependiente en la fluorescencia, que refleja mayor generación intracelular de ERO. Esta fluorescencia disminuyó preincubando las células con DPI (inhibidor de la NADPH-oxidasa) y con rotenona. El incremento de AGNE en el grupo SM está probablemente asociado con la disminución del grado de fosforilación de IR- β e IRS-1 sugiriendo una posible disminución en la sensibilidad del receptor de insulina. El mecanismo por el cual los AGNE inducen este efecto puede estar relacionado con la generación de estrés oxidativo, ya que el antioxidante NAC utilizado protegió contra este evento y mantuvo la fosforilación basal del IR- β en presencia de AO. Además el aumento de la fluorescencia del DCF, en células aisladas, por la presencia del AO reflejó una mayor generación de ERO.

SUMMARY

The metabolic syndrome (MS) is a heterogeneous pathology whose clinical manifestations include dyslipidemia, abdominal obesity, resistance to insulin and hypertension; these factors increase the risk of developing diabetes mellitus type II and diverse cardiovascular illnesses. The resistance to insulin (RI) is a common denominator and the nexus with the rest of the manifestations. The IR has a close relationship with obesity and the increase in the concentration of plasma non-esterified fatty acids (NEFA). The mechanism by which NEFA reduces the sensitivity to insulin is not completely clear. The objective of this work was to investigate the mechanism by which NEFA induces resistance to insulin in a model of metabolic syndrome.

In this work significant differences in total plasma NEFA were observed between the control group and the group with MS in both plasma and liver homogenate. The analysis of the composition of the NEFA showed that oleic acid increased significantly in plasma (0.15 ± 0.02 vs MS 0.32 ± 0.06 mM) and in liver (11.1 ± 6.5 vs MS 32.1 ± 8.5 $\mu\text{mol/mg}$ protein, $p < 0.001$). The analysis by Western Blot of the total quantities of insulin receptor- β (IR- β) and IRS-1 in the liver homogenate didn't show significant differences between the two groups. As for the phosphorylation of these proteins, the analysis showed a decrease in the degree of phosphorylation of IR- β in the MS group with regard to the control group. In the presence of oleic acid, the phosphorylation of the insulin receptor diminished significantly in both control and MS rats. The treatment of the animals with 1mM N-acetyl-cysteine (NAC) before administering oleic acid (60 μM) preserved the degree of phosphorylation of

the insulin receptor. The phosphorylation of IRS-1 in liver from MS rats was not significantly different from the control group.

Hepatocytes labeled with DCF-DA when incubated with oleic acid at different concentrations showed a dose-dependent increase in the fluorescence of DCF that reflected an increased generation of intracellular ROS. This fluorescence diminished when the cells were preincubated with DPI (an inhibitor of NADPH-oxidase) and with rotenone. The increased NEFA in the MS group is probably associated with the decrease in the phosphorylation degree of the Insulin receptor and IRS-1, suggesting a possible decrease in the sensitivity to insulin. The mechanism by which the NEFA induce this effect can be related to the generation of oxidative stress, since the anti-oxidant NAC protected against this event and it maintained the basal phosphorylation of the insulin receptor in the presence of oleic acid. Also the increase in the fluorescence of DCF in isolated cells, due to presence of oleic acid reflected a large generation of ROS.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. SÍNDROME METABÓLICO.

El síndrome metabólico (SM) es una patología heterogénea cuyas manifestaciones clínicas incluyen la resistencia a la insulina, la dislipidemia (hipertrigliceridemia e hipoalfalipoproteinemia), la obesidad abdominal y la hipertensión; estos factores aumentan el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo II y diversas enfermedades cardiovasculares (1). El incremento exponencial de la prevalencia de esta patología en los últimos años puede deberse a los cambios higiénico dietarios en el estilo de vida –especialmente los relacionados con la obesidad- que influyen sobre los diversos genes reguladores de los mecanismos metabólicos involucrados (2). En el futuro se podrá disminuir el impacto negativo que el SM ejerce sobre la salud en la medida en que se logre una comprensión exhaustiva de los diversos modos de interacción entre la carga genética, la nutrición y el medio ambiente (3,4).

Este síndrome mencionado por primera vez en 1988 por Reaven, describe el enlace entre la resistencia a la insulina y la hipertensión arterial, dislipidemias, diabetes tipo II y otras anormalidades metabólicas, asociadas al aumento en el riesgo de enfermedad cardiovascular en adultos (1). Reaven denominó a este cuadro “síndrome X” pero, no incluyó la obesidad en él; sin embargo, la obesidad se ha recogido en el concepto de síndrome metabólico en todas las definiciones posteriores (5, 6, 7, 11).

1.1.1. SÍNDROME METABÓLICO SEGÚN LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SALUD (OMS, AÑO 1999) (5).

La OMS señala que es indispensable para el diagnóstico de síndrome metabólico (SM) la presencia de resistencia a la insulina y/o alteración en la tolerancia a la glucosa (5). A esto debe sumarse al menos dos de los siguientes: hipertensión arterial, dislipidemia, obesidad, microalbuminuria. Es importante destacar que la microalbuminuria es considerada por la OMS un importante predictor de riesgo cardiovascular, ya que en la última década han proliferado datos experimentales y clínicos que relacionan la presencia de microalbuminuria, no solamente como un marcador de riesgo renal, sino frecuentemente asociado a la hipertensión arterial, y como un potente indicador de riesgo de morbi-mortalidad cardiovascular, no solamente en pacientes diabéticos (8, 9), sino también en hipertensos (10). Los criterios de la OMS para definir SM son:

-Alteración de la regulación de la glucosa.

Glicemia en ayunas ≥ 110 mg/dL y/o 2 hr poscarga ≥ 140 mg/dL

-Resistencia a la Insulina.

Captación de glucosa por debajo del P_{25} en pinza euglicémica.

-Otras variables:

-Presión arterial $\geq 140/90$ mmHg

-Dislipidemia (TG > 150 mg/dL y/o colesterol HDL < 35 -39 mg/dL en hombres y mujeres)

-Obesidad (índice cintura/cadera > 0.9 -0.85 en hombres y mujeres respectivamente y/o índice de masa corporal > 30 Kg/m²)

-Microalbuminuria (excreción urinaria de albúmina ≥ 20 mg/min).

1.1.2. SÍNDROME METABÓLICO SEGÚN *NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM* (NCEP, AÑO 2001).

El Adult Treatment Panel III (ATP III) (6), considera a la epidemia de obesidad como la principal responsable en el aumento de prevalencia del SM, e identifica como componentes del mismo a:

• Obesidad abdominal	Circunferencia cintura
Hombres	> 102 cm
Mujeres	> 88 cm
• Triglicéridos altos	≥ 150 mg/dL
• Colesterol HDL bajo	
Hombres	< 40 mg/dL
Mujeres	< 50 mg/dL
• Hipertensión arterial	≥ 130/ ≥ 85 mmHg
• Hiperglucemia en ayunas	≥ 110 mg/dL

La definición del NCEP se basa en la coexistencia de cualquier combinación de tres alteraciones: la distribución de grasa corporal, presión arterial, triglicéridos, HDL, y glucemia en ayunas (6).

A diferencia de lo establecido por la OMS, el NCEP en su definición de SM no incluía una cuantificación específica de la sensibilidad a la insulina y adoptó un abordaje menos “glucocéntrico”, considerando por igual a todos los componentes del SM. La definición ATP-III tiene parámetros clínicos que se pueden determinar fácilmente y de manera sistemática en la mayor parte de los contextos clínicos y de investigación.

1.1.3. SÍNDROME METABÓLICO SEGÚN LA ASOCIACIÓN AMERICANA DE ENDOCRINÓLOGOS CLÍNICOS (AAEC) (11).

La AAEC efectuó una modificación de la definición ATP-III. Esta nueva definición estaba basada en la consideración de que la resistencia frente a la insulina constituía el problema central (11). La AAEC propuso cuatro factores indicadores del SM: elevación de la concentración de triglicéridos, disminución de la concentración de cHDL, incremento de la presión arterial y aumento de las concentraciones de glucosa, tanto en ayunas como después de la administración de glucosa. Diversos factores como la obesidad, diabetes gestacional, enfermedad cardiovascular, los antecedentes familiares de diabetes, la hipertensión, la edad mayor a los 40 años y el estilo de vida sedentario fueron considerados elementos que incrementan la probabilidad del síndrome.

-Resistencia a la Insulina (medida por hiperinsulinemia dependiente de los niveles de glucosa).

-Sobrepeso $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$

-Obesidad abdominal circunferencia abdominal

Hombres > 102 cm

Mujeres > 88 cm

-Colesterol HDL < 45 mg/dL en mujeres

< 35 mg/dL en hombres

-TG $\geq 150 \text{ mg/dL}$

-Hipertensión arterial $\geq 130/85 \text{ mmHg}$

-Glicemia 2 hr postcarga > 140 mg

-Glucosa en ayunas 110 – 126 mg/dL

1.2. FISIOPATOLOGÍA DEL SÍNDROME METABÓLICO

La patogénesis del síndrome metabólico es compleja y deja muchos interrogantes. Intervienen tanto factores genéticos como ambientales, que influyen sobre el metabolismo de los lípidos y de los carbohidratos (Figura 1) (12).

1.2.1. FACTORES AMBIENTALES.

La inactividad física promueve el desarrollo de obesidad y disminuye la sensibilidad a la insulina en el músculo. Las dietas con alto contenido en grasas y carbohidratos favorecen el síndrome metabólico y contribuyen al desarrollo de hipertensión arterial y obesidad (13,14).

1.2.2. FACTORES GENÉTICOS

Numerosas investigaciones demostraron la agregación familiar que presenta esta patología, y aunque es difícil determinar el papel específico de cada uno de los factores genéticos y ambientales, un estudio de mellizos reveló que la carga genética ejerce una mayor influencia sobre la intolerancia a la glucosa, la obesidad y las bajas concentraciones del colesterol HDL, mientras que el medio ambiente tiene un mayor impacto sobre el hiperinsulinismo, la hipertensión y la hipertrigliceridemia (15, 16)).

La obesidad es clave en el desarrollo del SM. En 1994 se describió un gen en el tejido adiposo de la rata genéticamente obesa, que codifica una proteína llamada leptina. En esta línea genética existe un defecto que induce un déficit en la secreción de leptina. La administración de leptina reduce la ingesta alimenticia, incrementa el gasto energético y se asocia a una importante reducción del peso

corporal (17). Investigaciones posteriores han permitido clonar su RNA, aislar y sintetizar leptina y desarrollar un radioinmunoensayo para su determinación sérica (18). Todo ello sugirió que estábamos frente a la señal fundamental, más aun cuando se identificó el gen en el tejido adiposo humano (19). Pero estudios posteriores han encontrado también ratas obesas con leptina elevada, lo que ha planteado la posibilidad de alteraciones en receptores de leptina, los cuales se están estudiando actualmente.

En el ser humano se ha demostrado una correlación positiva muy estrecha entre los niveles de leptina y la cantidad de masa grasa, lo que plantea la posibilidad de que la obesidad humana sea un problema de resistencia a la leptina (20).

Por otra parte, la gran cantidad de mecanismos metabólicos involucrados indica que la fisiología debe estar regulada por la acción moderada de múltiples genes y no por un solo gen con efectos de gran intensidad. Investigaciones recientes han identificado al gen PPAR -asociado a la diabetes tipo II- como candidato para conferir susceptibilidad al SM, ya que regula la adipogénesis y el metabolismo de los lípidos y la glucosa (21). Se postuló que una dieta rica en ácidos grasos saturados afectaría la acción protectora que tendrían algunos alelos del gen PPAR, pero las investigaciones disponibles muestran resultados dispares al respecto. Es necesario tener en cuenta que las interacciones entre los genes y los componentes nutricionales de la dieta pueden ser alterados por factores ambientales como el ejercicio físico, entre otros (22).

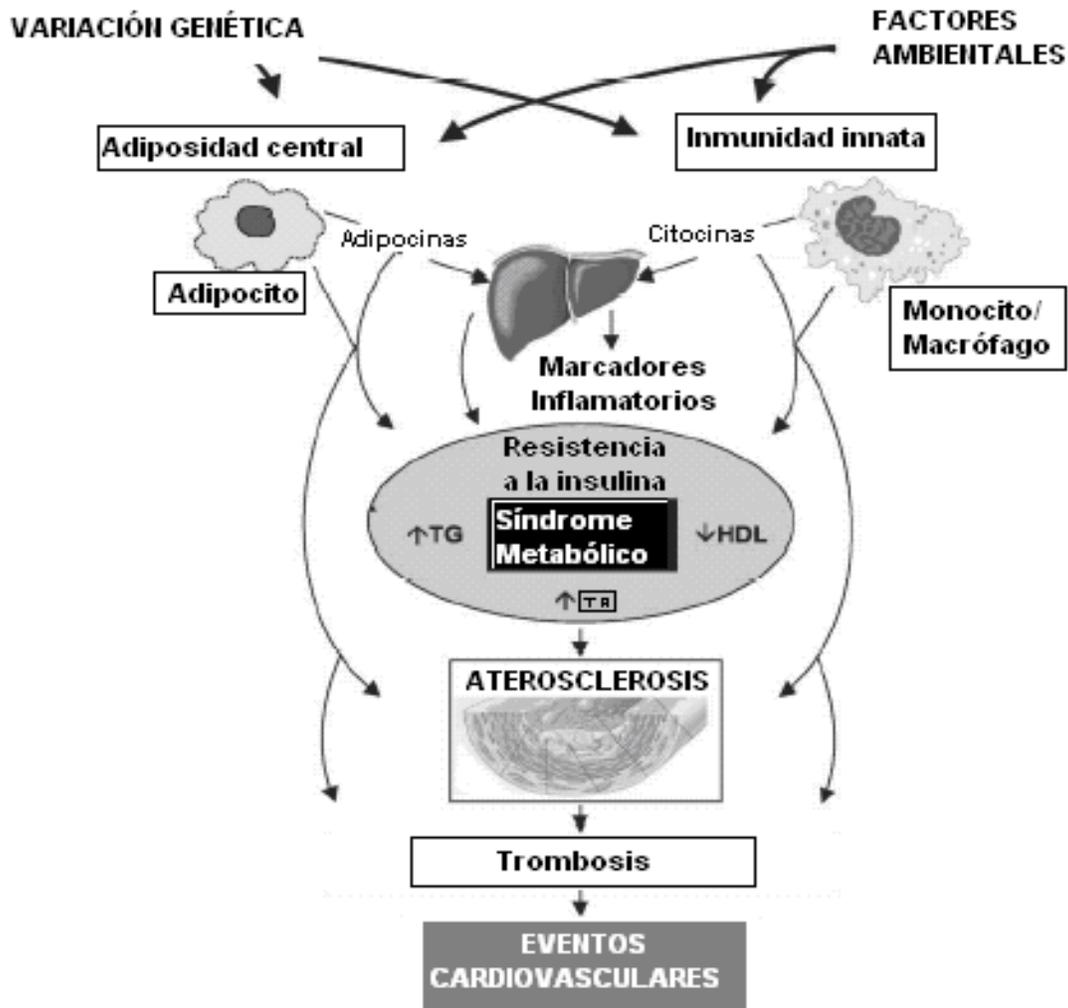


Figura 1: Fisiopatología del síndrome metabólico y su relación con el riesgo cardiovascular. Tomado de Reilly MP, et al, Circulation 2003 (12).

1.3. ALGUNOS COMPONENTES IMPORTANTES DEL SÍNDROME METABÓLICO

Según la definición ATP-III la interrelación de tres manifestaciones clínicas definen al SM (6). En el laboratorio se desarrolló un modelo animal con SM, entre los principales elementos que hemos considerado importante destacar de este modelo se encuentran: la hipertensión arterial, la obesidad intra-abdominal, dislipidemia y la resistencia a la insulina (23).

1.3.1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL (HTA).

Se conoce que en la patogenia de la hipertensión arterial intervienen múltiples factores: genéticos, ambientales, endócrinos, metabólicos, etc. Los más importantes son aquéllos relacionados con el estado de resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia (Figura 2):

- Activación del sistema Renina-Angiotensina
- Efecto estimulador del sistema nervioso simpático
- Aumento del gasto cardiaco
- Incremento en la reabsorción de sodio y agua a nivel renal
- Disminución de la acción vasodilatadora de la insulina

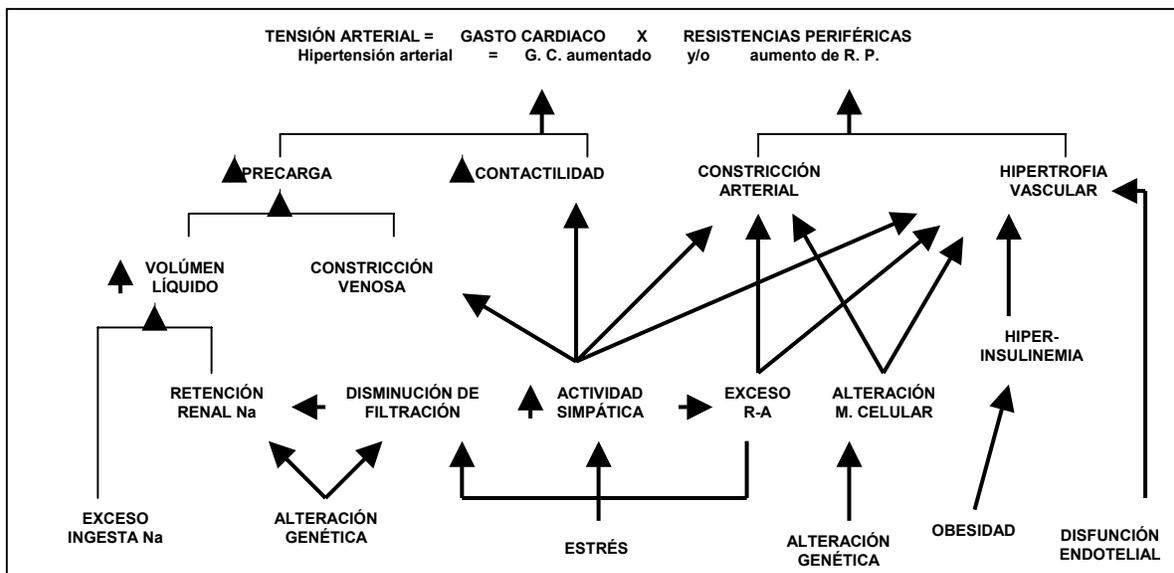


Figura 2. Esquema representativo de los factores fisiopatológicos de la hipertensión arterial. GC, gasto cardíaco; R-A, sistema renina-angiotensina; RP, resistencias periféricas.

Desde hace años se conoce la asociación entre HTA e hiperinsulinemia sobretodo junto con obesidad, pero también en no obesos. Los obesos son hiperinsulinémicos por presentar resistencia a la insulina. La insulina tiene un efecto presor relacionado con aumento de actividad simpática, hipertrofia vascular y aumento de reabsorción de sodio que es contrarrestado por efecto vasodilatador mediado por la síntesis de óxido nítrico (ON) (24). En la resistencia a la insulina fallaría esta respuesta vasodilatadora (25) y podría ser causa de HTA o potenciarla. Se ha encontrado aumento de reactividad vascular en mujeres obesas con resistencia a la insulina, sugiriéndose como posible marcador de HTA (26).

Por otra parte, en un estudio donde se comparan dietas con diferentes concentraciones de sodio se demostró que alto contenido de sodio en la ingesta influye en los niveles de presión arterial aumentando el Factor Natriurético Auricular, disminuyendo la actividad del Sistema Renina Angiotensina, pero sobre todo, disminuyendo el ON. Estos efectos dependen del grado de sensibilidad a la insulina (27). En un estado de RI, esta relación entre el contenido de sodio en la dieta y el ON se pierde y este último es incapaz de compensar el incremento en la presión arterial inducido por aumento en los niveles de sodio plasmático.

Se conoce una estrecha relación entre la hipertensión arterial y el tejido adiposo visceral. Ésta puede ser atribuida a varias sustancias liberadas por el tejido graso en exceso tales como: PAI, AGNE, leptina. Esta última se incrementa a medida que aumenta el Índice de Masa Corporal (28): Ruiloge sugiere que la obesidad podría afectar la presión arterial a través de la leptina, ya que ésta estimula la actividad del sistema nervioso simpático y el sistema renina-angiotensina.

1.3.2. OBESIDAD ABDOMINAL

La obesidad es una enfermedad crónica cuya prevalencia va en aumento, siendo en los países desarrollados y aún en los no desarrollados un problema grave de salud pública, por lo que su prevención es un reto importante (5). Con la edad disminuye la masa muscular y aumenta la obesidad. El sedentarismo y el abuso de dietas ricas en carbohidratos y grasas deben ser combatidos en todas las edades.

La obesidad es el aumento del tejido adiposo en el organismo como consecuencia de una dieta hipercalórica asociada a un bajo gasto energético por la inactividad física, cualquier aumento del depósito graso se asocia con un mayor riesgo de SM y enfermedad cardiovascular, pero la obesidad abdominal o de distribución androide y muy especialmente el acumulo de tejido adiposo visceral-abdominal es el más relacionado con SM (29,30).

Desde el punto de vista antropométrico, se ha utilizado el índice de masa corporal (IMC) para medir obesidad en los humanos, resultante del cociente entre el peso en kilogramos y la altura del individuo en metros al cuadrado. Un valor superior a 30, es indicativo de obesidad (5). En la actualidad se considera el índice cintura/cadera (ICC), más fiable que el IMC para el cálculo del riesgo cardiovascular. Cuando supera 0.9 en hombres y 0.85 en mujeres es indicativo, a diferencia del IMC, de obesidad abdominal (31).

En 1999, European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) (7) introdujo el perímetro de la cintura (94 cm en los varones y 80 cm en las mujeres) como medida de la adiposidad. El parámetro de cuantificación de la obesidad para el NCEP seguía siendo el perímetro de la cintura, aunque con valores umbral

superiores al descrito por el EGIR (102 cm en los varones y 88 cm en las mujeres) (6).

Estas son prácticas sencillas, simples y útiles para determinar obesidad abdominal, las cuales se asocian con el riesgo cardiovascular en los pacientes; pero que no diferencia el tejido graso subcutáneo del visceral abdominal (que es altamente activo en la liberación de sustancias). Para determinar con certeza este último, se requieren técnicas más complejas y costosas que las medidas antropométricas mencionadas, como la Tomografía Axial Computarizada (TAC) y la resonancia magnética nuclear (RMN) (31) (Figura 3).

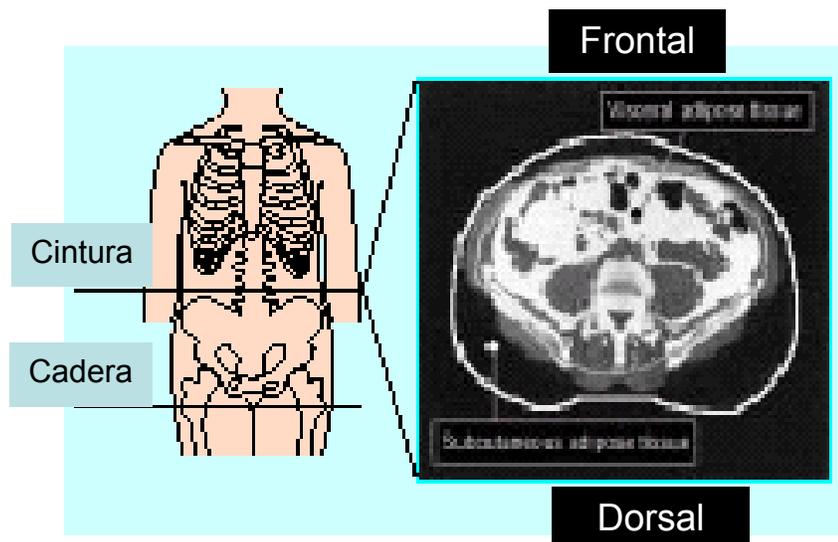


Figura 3. La TAC muestra con mayor precisión el acúmulo de grasa intra-abdominal visceral que la circunferencia de la cintura. Extraído y modificado de Després, 2001 (31).

1.3.3. DISLIPIDEMIA

Lo más frecuente de observar en el SM es una hipertrigliceridemia, con aumento ligero del colesterol total, pero con una notoria disminución del colesterol HDL. El incremento de triglicéridos se debe a una mayor síntesis hepática proveniente de un aumento de la oferta de AGNE en un estado de hiperinsulinemia por resistencia a la insulina. Con el aumento del flujo de ácidos grasos al hígado se produce un aumento de VLDL ricas en TG y un aumento de la producción de Apolipoproteína B (Apo B) (Figura 4) (32).

Otra alteración importante en el SM es la disminución del colesterol HDL. Esta reducción es una consecuencia de cambios en la composición y metabolismo de las HDL explicable por la hipertrigliceridemia, ya que en estas circunstancias, y por transferencia intravascular de lípidos, las HDL reciben triglicéridos y aceleran su catabolismo a través de una mayor actividad de la lipasa hepática. En presencia de hipertrigliceridemia hay un decremento en el contenido de colesterol esterificado del núcleo de las lipoproteínas, haciendo de éstas partículas pequeñas y densas. Estos cambios en la composición de las lipoproteínas resultan en un incremento en el tiempo de remoción de las HDL por la circulación (Figura 4) (32,33).

Las LDL se modifican en forma similar. Éstas, aunque pueden permanecer en igual número, presentan aumento en la proporción de partículas pequeñas, densas, aterogénicas y un incremento en la concentración de Apo B (un marcador de la concentración de lipoproteínas aterogénicas). Esto se asocia a un aumento en el riesgo de enfermedad coronaria cardíaca. Las LDL densas y pequeñas tienen un mayor potencial aterogénico y menor afinidad con los receptores Apo B

que las LDL comunes; son más tóxicas para el endotelio, por su menor tamaño atraviesan la membrana basal del endotelio con facilidad (34). Además, se conoce que su pequeño tamaño hace que tengan mayor afinidad por los glucosaminoglicanos de la íntima de la pared arterial y que sean más susceptibles a la oxidación y como consecuencia de ello, a ser fagocitadas por los macrófagos (35) lo que conduce a la aparición o progresión de la enfermedad ateromatosa.

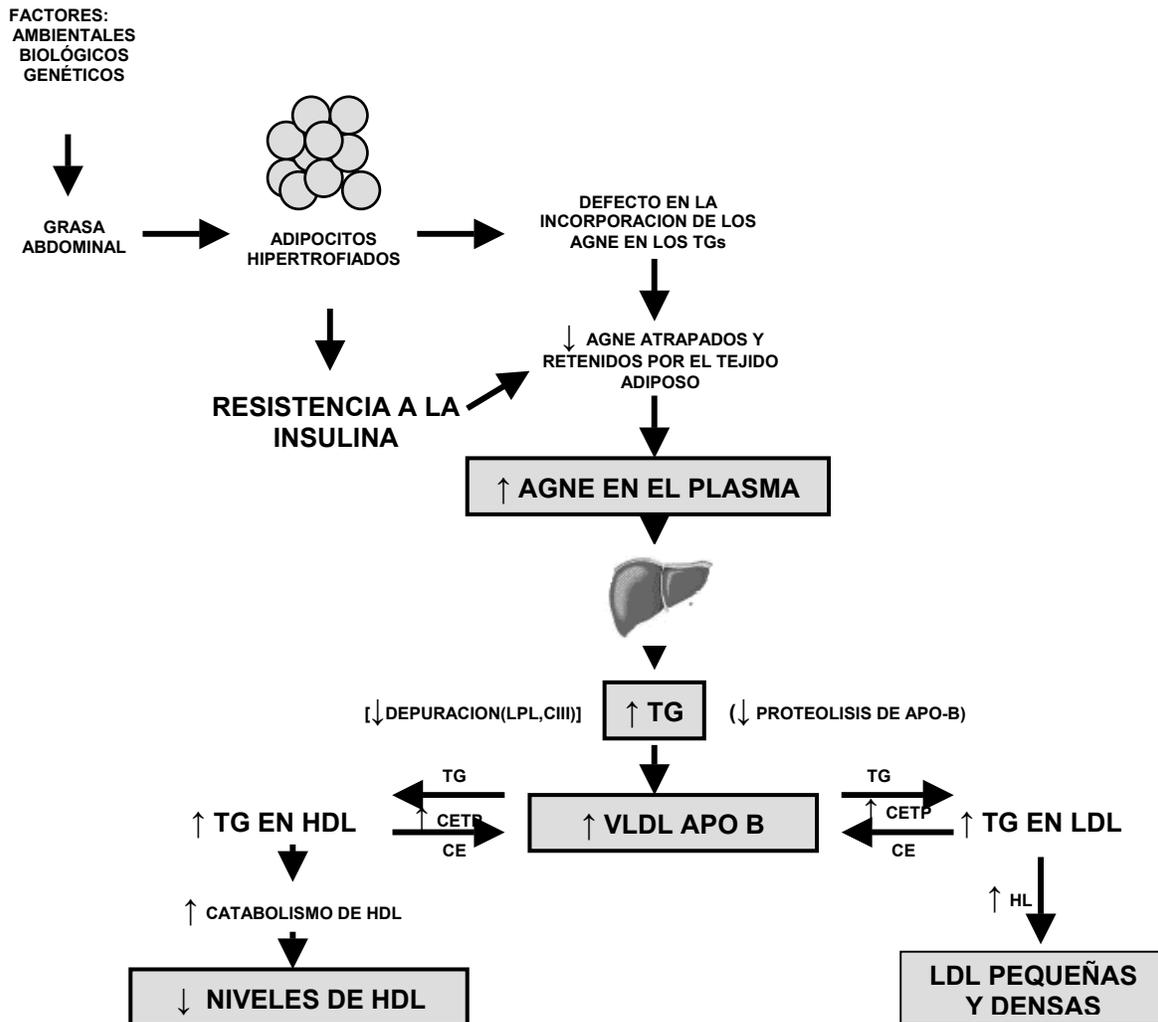


Figura 4. Representación esquemática de la dislipidemia en el síndrome metabólico. Tomado y modificado de Kolovou et al, 2005(32). AGNE, ácidos grasos no esterificados; TG, triglicéridos; LPL, lipoproteinlipasa; CIII, apolipoproteína CIII; HDL, lipoproteínas de alta densidad; CETP, proteína transportadora de éster de colesterol; CE, éster de colesterol; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; HL, lipasa hepática.

Desde el punto de vista clínico, la concentración de Apo B, colesterol HDL y la concentración de TG son las variables mejor relacionadas entre si con la dislipidemia del SM, pero sólo la medición de estos dos últimos se recomienda en la práctica clínica en el momento actual.

1.3.4. RESISTENCIA A LA INSULINA (RI).

Se define como la disminución de la capacidad de los tejidos para responder a una concentración específica de insulina y producir la respuesta fisiológica que mantiene la homeostasis de la glucosa (hiperinsulinemia con euglicemia). En situaciones normales tras una ingesta de alimentos, los niveles de glucosa en plasma suben. Este aumento es detectado por la célula β del páncreas que procede a la secreción de insulina para mantener los niveles de glucosa constantes. La insulina secretada por el páncreas ejerce las siguientes funciones en los tejidos periféricos: 1) estimula la captación de glucosa por parte del músculo, 2) inhibe la producción hepática de glucosa y 3) inhibe la hidrólisis de las grasas del tejido adiposo y estimula la captación de glucosa en el mismo tejido. Todo ello conlleva una disminución de los niveles de glucosa en plasma.

La RI aparece en la mayoría de los sujetos con SM y para muchos autores la resistencia a la insulina es un denominador común entre el resto de las manifestaciones (36) por lo que en algunos casos, el término "Síndrome de RI" y "SM" se llegan a utilizar como sinónimos (12, 37,38).

Algunos investigadores proponen que la RI tiene un papel preponderante en la patogénesis del SM porque de ésta, y del hiperinsulinismo, derivan los factores de riesgo metabólicos. Pero habría que recordar que para el diagnóstico de SM según el NCEP no es indispensable la presencia de RI, considerando sólo la glicemia basal alterada como un criterio más, que puede estar ausente (6).

Por otro lado, la RI tiene una estrecha relación con la obesidad y el incremento anormal de AGNE siendo la causa primordial de RI (39).

1.4. OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA.

La obesidad juega un papel preponderante ya que el tejido adiposo, sobre todo el visceral o abdominal, es muy activo en la liberación de distintas sustancias: AGNE, factor de necrosis tumoral α (FNT α), leptina, resistina, inhibidor del activador del plasminógeno (PAI₁), IL6, etc.(40). Estos factores pudieran favorecer la aparición de resistencia a la insulina, de daño endotelial y de un estado pro-inflamatorio (41).

Por otro lado, la obesidad tiene una estrecha relación con la resistencia a la insulina (RI). Generalmente, la RI aumenta con el incremento del contenido de grasa corporal (42). Los AGNE que se generan aumentan su concentración en la circulación. También hay mayor producción de AGNE en hígado que conduce a: aumento de gluconeogénesis que se traduce en incremento en la producción de triglicéridos: aumento de VLDL, LDL, con efecto aterogénico y esteatosis hepática no alcohólica por depósito de triglicéridos (43).

En músculo, se acumula tejido graso y se estimula la utilización de AGNE como fuente de energía en lugar de glucosa (favorecidos por la RI). Esta glucosa

no utilizada a nivel muscular, sumada a la mayor producción de glucosa hepática, genera hiperglicemia. En respuesta a esto, el páncreas incrementa la secreción de insulina (hiperinsulinemia) siendo esto lo que se conoce como resistencia a la insulina.

El exceso de tejido adiposo no sólo incrementa la resistencia a la insulina en forma indirecta mediante alteraciones en los triglicéridos, sino que además secreta factores inflamatorios (adipocitocinas o adipocinas) que tienen efectos directos sobre la sensibilidad a la insulina (44).

Muchas investigaciones sugieren que el factor central del síndrome metabólico es la resistencia a la insulina asociada a la obesidad. La liberación de citocinas y AGNE que sobrecargan los músculos y el hígado graso son mecanismos que pueden inducir la resistencia a la insulina; sin embargo esto puede ser más complejo (45,46).

1.5. ÁCIDOS GRASOS NO-ESTERIFICADOS (AGNE).

1.5.1. NOMENCLATURA DE LOS AGNE

La nomenclatura simplificada para estos compuestos especifica la longitud de la cadena y el número de dobles enlaces, separados por dos puntos, por ejemplo: el ácido palmítico es un ácido saturado de 16 carbonos que se abrevia 16:0, mientras que el ácido oleico que tiene 18 carbonos y un doble enlace se abrevia 18:1 (Tabla 1).

La posición de cualquier doble enlace se especifica por números en “superíndice” después de la letra griega delta; por ejemplo, un ácido graso de 20

carbonos con un doble enlace entre C-9 y C-10 (donde C-1 es el carbono carboxilo) y otro entre C-12 y C-13 se designa 20:2 ($\Delta^{9,12}$). Los ácidos grasos que se encuentran más frecuentemente tienen números pares de átomos de carbono en una cadena de 12 a 24 carbonos sin ramificación (Tabla 1).

Los AGNE son un grupo de compuestos químicamente diversos, cuya característica principal es la de ser insolubles en agua. Sus funciones biológicas son muy variadas; por ejemplo, las grasas y aceites que constituyen la forma principal de almacenar energía en muchos organismos son elementos estructurales básicos de las membranas biológicas.

1.5.2. PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS DE LOS AGNE.

Las propiedades físicas de los ácidos grasos están determinadas por la longitud de la cadena y su grado de insaturación. Esta cadena de naturaleza hidrofóbica es la base de la poca solubilidad de los ácidos grasos en agua. Entre más larga es la cadena hidrocarbonada y menor el número de dobles enlaces, más baja es la solubilidad en agua. El grupo ácido carboxílico, de naturaleza polar, le confiere una ligera solubilidad en agua a los ácidos grasos de cadena corta.

A temperatura ambiente, los ácidos grasos de 12:0 a 24:0 tienen consistencia serosa. Así que la temperatura de fusión aumenta mientras el número de carbonos aumenta (ver Tabla 1). En cuanto a los ácidos grasos insaturados de mismo número de carbonos, la temperatura de fusión disminuye mientras el número de doble ligaduras aumenta.

Tabla 1. Ácidos grasos biológicos comunes.

Símbolo	Nombre común	Nombre sistemático	Estructura
Ácidos grasos saturados			
12:0	Ácido laurico	Acido dodecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14:0	Ácido mirístico	Ácido tetradecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16:0	Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
18:0	Ácido esteárico	Acido octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
20:0	Ácido araquídico	Acido eicosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
22:0	Ácido behénico	Acido docosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
24:0	Ácido lignocérico	Acido tetracosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$
Ácidos grasos insaturados (todos los dobles enlaces son cis)			
16:1	Ácido palmitoleico	Acido 9-hexadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:1	Ácido oleico	Acido 9-octadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:2	Ácido linoleico	Acido 9,12-octadecadienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3	Ácido α -linolénico	Acido 9,12,15-octadecatrienoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3	Ácido γ -linolénico	Acido 6,9,12-octadecatrienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
20:4	Ácido araquidónico	Acido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
20:5	EPA	Acido 5,8,11,14,17-eicosapentanoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
24:1	Ácido nervónico	Ácido 15-tetracosenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$

Hay un patrón común en la localización de los dobles enlaces; en muchos ácidos grasos monoinsaturados el doble enlace está entre C-9 y C-10 (Δ^9). Otros dobles enlaces normalmente están en posición 12 y 13. Los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados nunca están conjugados (dobles enlaces alternados, -CH=CH-CH=CH-), sino separados por un grupo metileno (-CH-CH=CH-CH₂-CH=CH-).

1.5.3. MOVILIZACIÓN DE LOS AGNE DEL TEJIDO ADIPOSO.

El tejido adiposo obtiene su mayor parte de ácidos grasos a partir del hígado o de la dieta. Los ácidos grasos son activados mediante la formación del correspondiente acil-CoA, y a continuación son esterificados con el glicerol-3-fosfato a triacilglicerol para ser almacenados (47). El glicerol-3-fosfato se genera a partir de la reducción de la hidroxacetona la cual aumenta durante la glucólisis.

Los adipocitos tienen un sistema de lipólisis y uno de lipogénesis que están continuamente activos. Estas dos reacciones son diferentes y utilizan diferentes reactivos y sustratos. Sin embargo el tejido adiposo no es únicamente un depósito pasivo de la grasa. De hecho, después del hígado, el tejido adiposo es el más importante en el mantenimiento de la homeostasis metabólica.

Muchos de los factores nutritivos, metabólicos y hormonales que regulan el metabolismo del tejido adiposo actúan ya sea sobre el proceso de la lipólisis o de la lipogénesis. En los procesos de la lipólisis, la lipasa hormono-sensible (LHS), es la enzima limitante en la liberación de los ácidos grasos a partir del tejido adiposo (Figura 5). Esta enzima es susceptible a la fosforilación y a la desfosforilación en respuesta a los niveles del AMPc controlado hormonalmente (48). La fosforilación activa la LHS estimulando la lipólisis en el tejido adiposo, elevando la concentración de los AGNE circulantes y finalmente activando la ruta de la β -oxidación en otros tejidos u órganos, tales como el hígado y el músculo esquelético (49). En el caso de una dieta alta en carbohidratos, los altos niveles de la insulina secretada en respuesta a concentraciones elevadas de glucosa en la sangre disminuyen los niveles de AMPc. Esta situación conduce a la desfosforilación de la lipasa hormono-sensible y por tanto, a su inactivación, inhibiendo la liberación de los ácidos grasos para la oxidación. En el caso de la diabetes tipo II con resistencia a la insulina, la LHS es insensible a la inhibición por la insulina y por consecuencia se observa un aumento en la concentración de los AGNE circulantes (Figura 5).

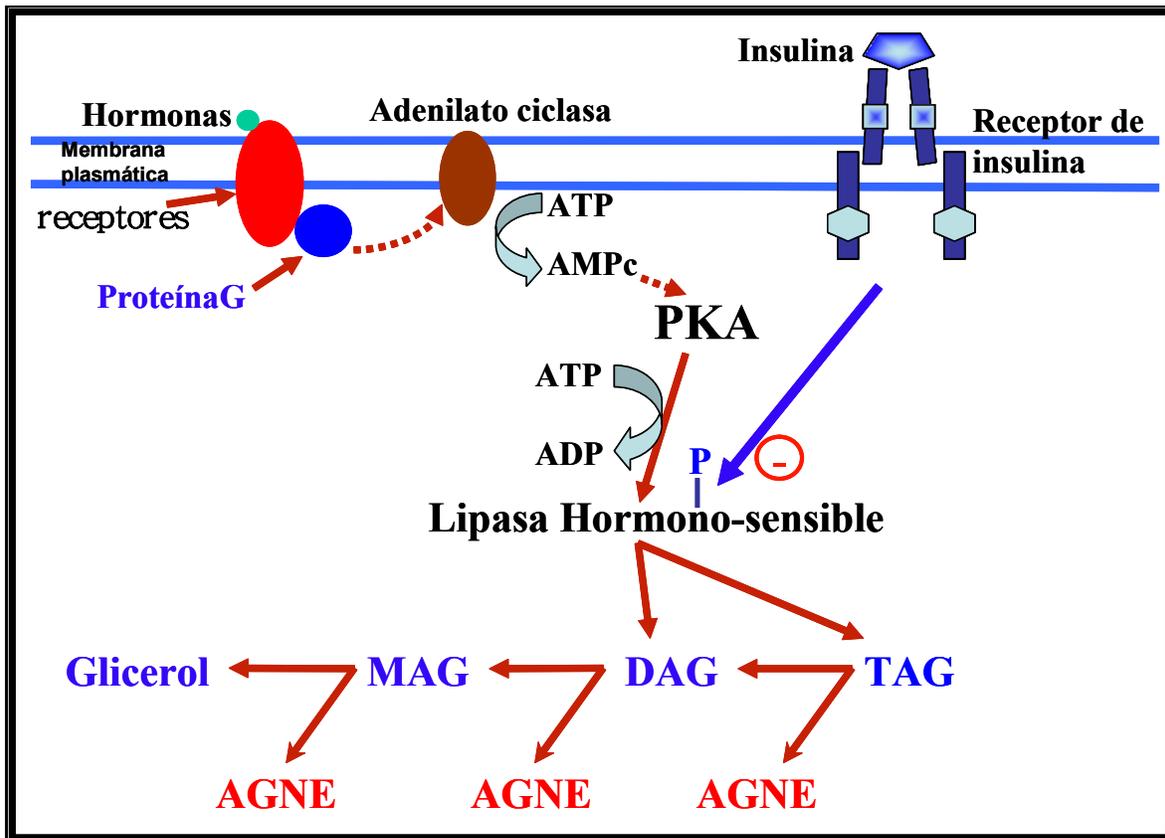


Figura 5. Movilización de los AGNE por hormonas en el adipocito.

En la obesidad con acumulación de la grasa intra-abdominal hay un aumento en la concentración de los AGNE circulantes (50). Un aumento en la concentración de AGNE movilizados del tejido adiposo a los tejidos no-adiposos pueden participar en la amplificación de las anomalías metabólicas que son características del síndrome de resistencia a la insulina y la diabetes tipo II (51). También es probable que juegue un papel importante en la progresión de la intolerancia a la glucosa. Los mecanismos bioquímicos precisos por los que AGNE y los triglicéridos del citosol ejercen sus efectos, permanecen aún desconocidos.

La mayor proporción de los AGNE circulan unidos a albúmina, mientras que otra parte permanece libre. En tejidos lipogénicos como el hígado y el tejido adiposo, los ácidos grasos se pueden sintetizar *de novo* (lipogénesis). Por lo tanto, el hígado, el tejido adiposo y el músculo serán los principales sitios de regulación génica por los ácidos grasos. Además de su función como moléculas energéticas, los ácidos grasos también actúan como señales implicadas en la regulación de la expresión génica.

1.5.4. TRANSPORTE DE LOS AGNE.

1.5.4.1. TRASPORTE PASIVO.

El transporte pasivo de un metabolito a través de una membrana biológica se basa en su difusión no mediada. Los movimientos de los lípidos pueden ser pasivos o simples a consecuencia de sus propiedades químicas; los problemas de la translocación transmembranal de los lípidos dependen del grado y de la naturaleza de los lípidos; los ácidos grasos pueden atravesar la membrana rápidamente por virtud de su solubilidad lipídica sin necesitar de una proteína facilitadora (52). El movimiento puede estar influenciado por factores extrínsecos como:

1. La carga.
2. Permeabilidad a la membrana.
3. pH de gradientes transmembranales.

4. Enzimas intracelulares que metabolizan ácidos grasos, éstas pueden alterar el equilibrio de los ácidos grasos de la membrana y resultar en su acumulación neta dentro de la célula y la necesidad de un transportador.

Los AGNE pueden girar (flip-flop) desde un lado de la bicapa al otro. El movimiento de los fosfolípidos desde un lado al otro de la bicapa puede mantener la asimetría de la membrana.

1.5.4.2. TRASPORTE ACTIVO.

Los ácidos grasos estimulan la transcripción de genes que codifican para proteínas implicadas en el transporte de ácidos grasos, como la proteína de unión a ácidos grasos (FABP o *fatty acid binding protein*), la translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36, *fatty acid translocase*). En la mitocondria los ácidos grasos atraviesan la membrana por medio del translocador de acil-carnitina que se encuentra en la membrana interna mitocondrial.

1.5.5. PAPEL DE LOS AGNE EN LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA

Una de las maneras por las cuales los ácidos grasos actúan como reguladores de la expresión génica es mediante la activación directa de la actividad transcripcional de algunos receptores nucleares de hormonas, como los receptores activadores del proliferador de peroxisomas o PPAR (*peroxisome proliferating activated receptors*). La activación de PPARs mediante la unión de determinados ácidos grasos a su dominio de unión a ligando, da lugar a una activación de la transcripción de genes relacionados con el propio metabolismo de los ácidos grasos, como la fosfoenolpiruvato carboxi-cinasa (53) o la FABP (54) y

las proteínas del metabolismo de ácidos grasos, como la LPL (lipoproteína lipasa), la CPT-I (*carnitine palmitoyltransferase I*) y las proteínas desacopladoras 2 y 3, entre otras. Por otro lado, también pueden inhibir la transcripción del transportador de glucosa GLUT4, la piruvato cinasa en hígado (L-PK o *liver piruvate kinase*), la sintasa de ácidos grasos (FAS o *fatty acid synthase*) y la leptina (55).

1.5.6. METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos se metabolizan mediante un proceso conocido como β -oxidación, en el cual los ácidos grasos son convertidos en acetil-CoA. La oxidación ulterior de acetil-CoA (a CO_2 y agua) es altamente exergónica, es decir libera una gran cantidad de energía en forma de ATP.

Las enzimas que degradan a los ácidos grasos para convertirlos en energía se encuentran en las mitocondrias, sin embargo, los ácidos grasos no pueden pasar directamente hasta este organelo, por lo que tienen que ocurrir tres reacciones químicas antes de poder acceder a ésta. La primera es catalizada por una familia de enzimas presentes en el exterior de la membrana mitocondrial, las acil CoA sintetasas. Las diferentes enzimas acil-CoA sintetasas son específicas para ácidos grasos de cadena corta, intermedias y larga. Posteriormente, la unión ácido graso-CoA se une a la carnitina para formar el complejo ácido graso acil-carnitina, por medio de una carnitina acil transferasa I. Posteriormente, el éster ácido graso acil-carnitina entra a la matriz mitocondrial por difusión facilitada a través del transportador acil-carnitina/carnitina. En la tercera y última etapa del proceso de entrada, el grupo ácido graso acil se transfiere enzimáticamente de la carnitina a la CoA intramitocondrial por la carnitina aciltransferasa II. Una vez en el

interior de la mitocondria, el ácido graso acil es metabolizado por una serie de enzimas, en un proceso conocido como β -oxidación (Figura 6).

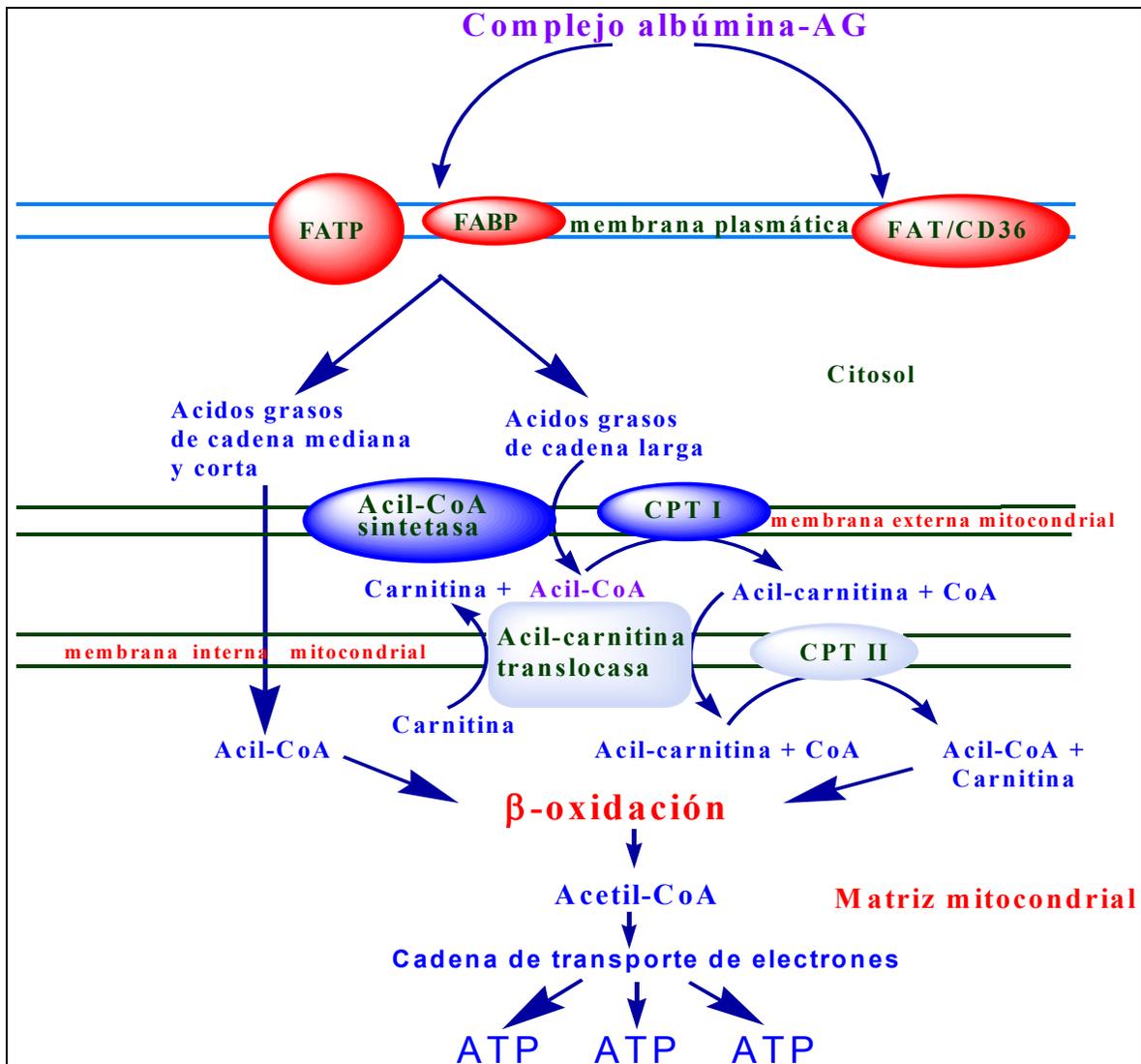


Figura 6. Transporte de los ácidos grasos al interior de la célula.

1.5.6.1. β -OXIDACIÓN

La oxidación de los ácidos grasos es un proceso que consta de tres etapas básicas que permiten la obtención de energía. En primer lugar, se oxida una cadena larga de ácido graso generando un residuo acetil en la forma de acetil-CoA. Este proceso es llamado β -oxidación. En la etapa 2, los grupos acetil se

oxidan a CO₂ vía el ciclo de ácido cítrico. En la etapa 3, los electrones derivados de las diferentes reacciones de oxidación de las etapas 1 y 2 pasan al O₂ a través de la vía de la cadena respiratoria de la mitocondria, produciendo la energía para la síntesis de ATP.

La acetil-CoA se oxida a CO₂ y agua, la acetil-CoA producida durante la β-oxidación puede ser oxidada a CO₂ y agua en el ciclo del ácido cítrico. La siguiente ecuación representa el balance para la oxidación de palmitoil-CoA:



1.5.7. AGNE Y ENFERMEDADES.

Las concentraciones fisiológicas de los AGNE circulantes deben ser mantenidas dentro de un rango muy estrecho, y un aumento anormal de ellos, se asocia a diversas enfermedades, entre ellas: obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y aterosclerosis. Trabajos realizados en indios Pima no diabéticos muestran que las concentraciones plasmáticas de AGNE son un factor predictor de diabetes mellitus tipo 2 (56).

Los mecanismos por los cuales los ácidos grasos libres conducen a éstas y otras enfermedades, no están del todo establecido, pero su contribución a la generación de la resistencia a la insulina, parece ser uno de los más importantes. Además existen evidencias de que los AGNE constituyen un vínculo importante entre la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID).

1.6. BIOQUÍMICA DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina se define como la disminución de la respuesta biológica a la actividad de la hormona que se refleja en alteración en las vías de señalización que resultan de la interacción de la insulina con su receptor.

La hiperinsulinemia que se presenta en la RI refleja la disminución de la sensibilidad de tejidos a la acción de la insulina. La composición de los ácidos grasos de la membrana es uno de los factores celulares que puede afectar la acción de la insulina. Las propiedades físico-químicas de la membrana son determinadas por la naturaleza de los ácidos grasos que componen los fosfolípidos de la bicapa lipídica que a su vez afectan diversas funciones celulares, incluyendo la respuesta a las hormonas (57). Un aumento en la proporción de los ácidos grasos poliinsaturados aumenta la fluidez membranal, el número de los receptores y la acción de la insulina (58,59). Existe una correlación positiva entre la sensibilidad a la insulina y la proporción de los ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos de músculo esquelético (60).

1.6.1. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA.

La insulina es una hormona capaz de iniciar múltiples vías de señalización que inducen las respuestas celulares inmediatas y a largo plazo. Los efectos inmediatos de esta hormona incluyen un incremento de la velocidad de captación de la glucosa desde la sangre hacia las células musculares y los adipocitos, y la modulación de la actividad de diversas enzimas que intervienen en el metabolismo de la glucosa. La exposición continua a insulina produce efectos más prolongados,

entre ellos un aumento de la expresión de las enzimas hepáticas que sintetizan glucógeno y de las enzimas de los adipocitos que sintetizan triacilgliceroles.

1.6.1.1. BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LA INSULINA.

La insulina tiene importantes funciones en la regulación del metabolismo intermediario de los carbohidratos, proteínas y grasas. Es un polipéptido constituido por dos cadenas de aminoácidos enlazadas por puentes disulfuro.

La insulina es sintetizada en el retículo endoplásmico de las células β del páncreas como parte de una pre-prohormona de mayor tamaño. La pre-proinsulina posee un péptido señal de 23 aminoácidos, el cual es removido al entrar en el retículo endoplásmico. El resto de la molécula posteriormente se pliega y se forman puentes disulfuro para constituirse en proinsulina. El péptido C que conecta las cadenas A y B de la insulina se desprende, por la acción de endoproteasas presentes en los gránulos, antes de la secreción (61).

1.6.2. RECEPTOR DE INSULINA

El receptor de la insulina es necesario para mediar la acción de la insulina. El receptor de insulina completo es una glicoproteína de membrana heterotetramérica compuesta de dos subunidades α y dos β , unidas por enlaces disulfuros (62). La unión de la insulina a la subunidad α extracelular en el receptor induce un cambio conformacional del receptor para unirse al ATP en el dominio intracelular de las subunidades- β . La unión del ATP activa la autofosforilación del receptor. Existen numerosos sitios de autofosforilación en el dominio intracelular

de las subunidades- β . Se han reconocido sitios con residuos de tirosina que juegan un papel funcional importante. Estos sitios incluyen Y¹¹⁵⁸, Y¹¹⁶⁰ y Y¹¹⁶² en el asa activa del dominio catalítico; Y⁹⁷² en el dominio yuxtamembranal y Y¹³²⁸ y Y¹¹³⁴ en el dominio del carboxilo terminal (63,64).

El sitio de autofosforilación yuxtamembranal juega un papel importante en la interacción entre el receptor y los sustratos intracelulares, que proveen un sitio de ensamble que incrementa la estabilidad del complejo receptor/sustrato.

1.6.3. SUSTRATO DEL RECEPTOR DE INSULINA (IRS).

Después de la autofosforilación del receptor, se inicia la activación de las tirosina cinasas de los IRSs. Se han identificado cuatro proteínas de IRS (del 1 al 4), siendo el IRS-1 e IRS-2 de 185 y 195 kDa, respectivamente, responsables del control de la glucosa (65). El papel del IRS-3 e IRS-4 no es del todo claro, experimentos de sobre-expresión de estas proteínas en adipocitos muestran un ligero mimetismo con la acción de la insulina.

Los IRSs son elementos claves en la acción de la insulina. La fosforilación de sus residuos de tirosina incrementa la afinidad con la cual los IRS se unen a otras moléculas de señalización. La ausencia de IRS-1 causa severos retardos en el crecimiento, con resistencia a la insulina, sugiriendo un importante papel del IRS-1 en las acciones de la insulina.

Las proteínas IRS contienen en su región N-Terminal un grupo homólogo a pleckstrina (PH) que se asocia con fosfolípidos de membrana y/o proteínas intracelulares, seguido de una proteína de unión a fosfotirosina la cual interactúa

con la tirosina 960 en el motivo NPXY del receptor de insulina (66,67). Otra región conservada es el motivo YXMM que se une al dominio SH12 de la subunidad p85 de PI3-cinasa. En la región carboxilo terminal, la única similitud entre los IRSs es los sitios de fosforilación. Por ejemplo, IRS-1 e IRS-2 tienen 35 % de homología en regiones para la interacción de lípido-proteína o proteína-proteína. Además, estas proteínas a través de los residuos de tirosinas tienen la capacidad de unirse a proteínas que presentan los dominios SH2 (homólogas al Ser-2) y los dominios SH3 (homólogas al Ser-3) que se unen a secuencias ricas en prolinas. Por análisis de la secuencia de los aminoácidos de los IRSs, se encontraron 70 residuos de tirosinas y 40 de serinas y treoninas. El mecanismo de regulación de la actividad de las tirosina cinasas es por acción de las fosfatasas SHP2 que apagan la fosforilación(68).

El IRS-1 fosforilado fija PI-3 cinasa, por lo que produce una estimulación diez veces superior de actividad de cinasa; a esto se debe el incremento de fosfoinosítidos que se observa en las células estimuladas por insulina. El aumento de fosfoinosítidos induce el reclutamiento de proteína cinasa B (PKB) hacia la membrana. La región terminal N de esta cinasa contiene un dominio PH que se fija a los fosfoinosítidos de la membrana plasmática y una vez localizada sobre la membrana, PKB es fosforilada, y por lo tanto activada por dos cinasas asociadas a membrana. Cuando la PKB fosforilada es liberada al citosol induce diversos efectos de la insulina, entre ellos la estimulación de la captación de glucosa y de la síntesis de glucógeno.

1.6.4. EL PAPEL DE LA FOSFATIDILINOSITOL 3-CINASA (PI-3 CINASA) EN LA ACCIÓN DE LA INSULINA.

En la cascada de señalización, la siguiente proteína en activarse es la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3-cinasa), que pertenece a la familia de proteínas con actividad enzimática que fosforilan a lípidos de inositol de la membrana.

La enzima PI-3-cinasa cataliza la adición de fosfatos en la posición D3 del anillo inositol de fosfoinositol, llevando a la generación de PI 3-fosfato. La enzima está compuesta de una subunidad reguladora de 85 kDa y una subunidad catalítica de 110 kDa (69). Los inosítidos 3-fosforilados actúan como mensajeros intracelulares, llevando a la activación de cinasas dependientes de PI, cambios en el tráfico intracelular y estimulación del desarrollo. La activación de PI3-cinasa es importante para muchas acciones de la insulina. El bloquear a esta enzima está asociado con la inhibición de la captura de glucosa estimulada por insulina, síntesis de proteínas, glucógeno y lípidos así como modulación de la expresión genética (70).

Existe suficiente evidencia de que la PI3-cinasa activada por insulina es capaz de habilitar el proceso de translocación del transportador 4 de glucosa (GLUT 4) (71).

1.6.5. TRANSPORTADORES DE GLUCOSA.

La etapa final para el control de la glucosa se efectúa mediante los transportadores de glucosa (GLUT). A la fecha se han identificado nueve transportadores del uno al cinco y del ocho al 11. El GLUT1 es un transportador constitutivo de la glucosa que se expresa en varios sitios como en el cerebro,

eritrocitos y en las células endoteliales. El GLUT2 posee baja afinidad por la glucosa, es el sensor en las células β del páncreas para la liberación de la insulina en presencia de altas concentraciones de glucosa; también se expresa en el riñón, en el epitelio del intestino delgado y en el hígado. El GLUT3, transportador de alta afinidad para la glucosa, se expresa en neuronas y placenta. El GLUT5 transportador de fructosa se expresa en el intestino delgado, en células espermáticas, en riñón, cerebro, en tejido muscular y adiposo. El GLUT8 transporta glucosa y es regulado hormonalmente a nivel testicular en el adulto (72,73).

El GLUT4, con peso molecular aproximado de 45 kDa, es el principal responsable de la incorporación de la glucosa al interior de las células musculares y de los adipocitos. El GLUT4 es una proteína que atraviesa 12 veces la membrana plasmática y es entre los dominios seis y siete donde se localiza el sitio de entrada de la glucosa. En ausencia de la insulina, alrededor del 90% del GLUT4 se encuentra secuestrado intracelularmente en vesículas que son llevadas hacia la membrana plasmática por la activación previa del complejo proteico PI3-cinasa, las proteínas PKB/Akt, PKC y la cinasa JNK. Las vesículas transportadoras contienen proteínas V-SNARE (sinaptobrevina), VAMP2 Y VAMP3 que interactúan físicamente con las proteínas T-SNARE (conocida como sintaxina 4 y SNAP23) que se encuentran localizadas en la cara interna de la membrana plasmática y otras proteínas accesorias se requieren en los eventos de anclaje y fusión de la membrana con las vesículas que contienen los GLUT. Además, en esta asociación participan las proteínas del citoesqueleto como la actina y la

tubulina que interactúan con los complejos proteicos para la movilización y anclaje de los GLUT en la membrana plasmática (73).

La estimulación por insulina de la captura de glucosa es mediada por la translocación de un grupo de GLUT4 a la membrana plasmática.

1.6.6. TIROSINAS FOSFATASAS.

Las tirosinas fosfatasas juegan un papel importante en la terminación de la señal generada por las tirosinas cinasas. Ha sido difícil identificar a las fosfatasas fisiológicas que regulan la señalización de la insulina por desfosforilación del receptor de insulina y sus blancos.

1.7. AGNE Y RESISTENCIA A LA INSULINA.

En obesos, la resistencia a la insulina a nivel de los adipocitos ocurre en una fase inicial, provocando el incremento de la hidrólisis intracelular de los triglicéridos (TG) y por consiguiente la disminución de la internalización de AGNE por los adipocitos (74).

En la mayoría de los obesos, los niveles de AGNE en plasma se encuentran elevados. Las elevaciones fisiológicas de los niveles de AGNE inhiben la entrada de glucosa a las células estimuladas por la insulina de manera dosis-dependiente en controles y pacientes de DMNID (75). Existen 2 mecanismos posibles para explicar este fenómeno: 1) la inhibición del transporte o la fosforilación de glucosa mediado por las grasas, lo cual ocurre de 3 a 4 h después de una infusión de grasas y 2) la disminución de la actividad de la glucógeno sintasa, que ocurre de 4 a 6 h después de una infusión de grasas.

Varios trabajos han demostrado que existe una correlación negativa entre la concentración de los AGNE plasmáticos y la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético (76-81). La administración de los AGNE a individuos sanos aumenta el riesgo de la diabetes tipo 2 (56,82), además los niveles de AGNE elevados están asociados con la resistencia a la insulina y la hipertensión (83,84) que son dos factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares (85,86).

En la literatura existe un gran debate sobre el posible papel que pueden tener los AGNE en el mecanismo por lo cual se desarrolla resistencia a la insulina y que caracteriza la diabetes tipo 2. Varios trabajos han demostrado que un aumento de los AGNE en el plasma por infusión de lípidos con heparina, induce resistencia a la insulina a corto plazo en sujetos sanos (87-90). El hecho es que los AGNE representan un denominador común entre diferentes factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares tales como la hipertensión, la obesidad y la diabetes.

Randle, en 1963 (91), fue el primero en describir en músculo diafragmático y cardíaco de rata, la inversa relación existente entre la oxidación de ácidos grasos y glucosa, determinado por una competencia por sustrato, en donde ante una mayor oferta de AGNE, el músculo prefiere oxidar éstos, disminuyendo la captación y fosforilación de glucosa y con ello la vía oxidativa (glucólisis) y no oxidativa (glucógeno) de ella.

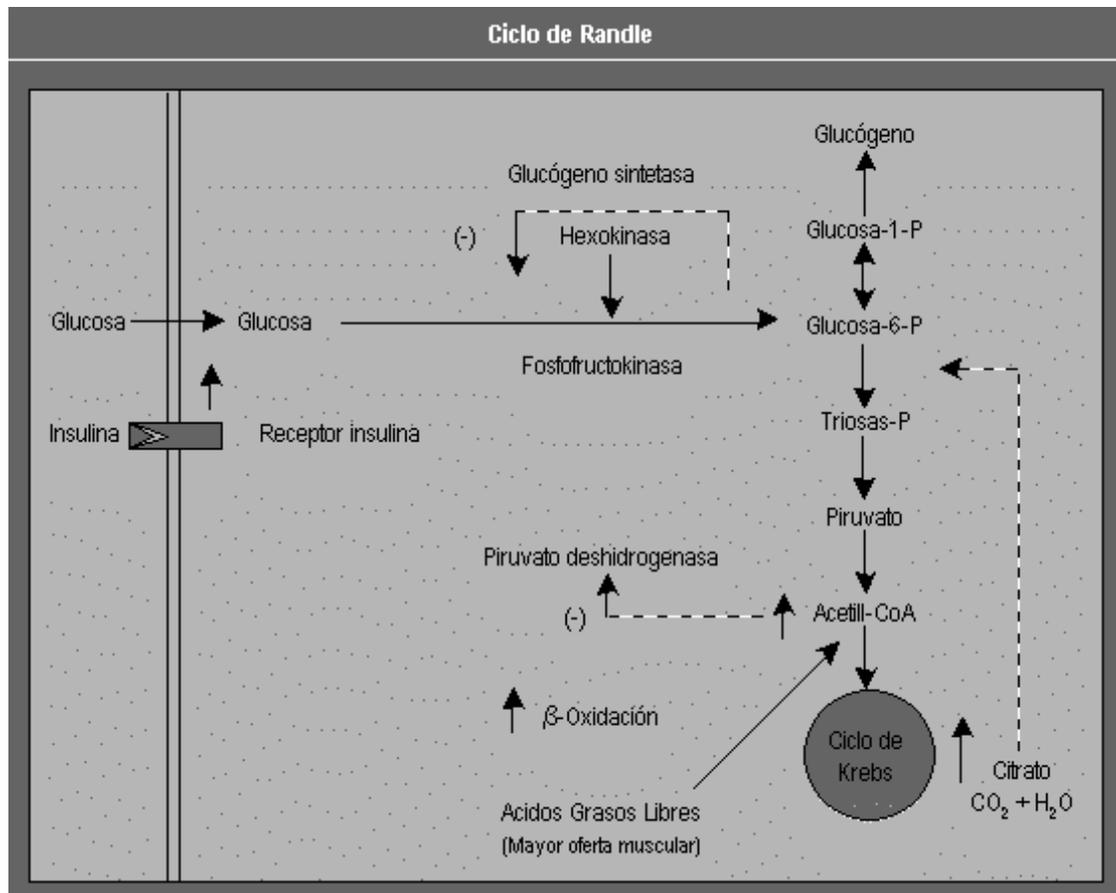


Figura 7. Ciclo de Randle o de la glucosa-ácido graso (91).

Esto estaría determinado por una inhibición de las enzimas piruvato deshidrogenasa y fosfofructocinasa, por parte de una incrementada producción de acetil-CoA/CoA mitocondrial y Citrato citoplásmico, respectivamente, ambos resultantes de la mayor oxidación de ácidos grasos, generando un incremento en las concentraciones de glucosa-6-fosfato, lo que en último término podría inhibir alostéricamente la hexocinasa II y el transporte de glucosa (91) (Figura 7).

Por lo tanto el mecanismo propuesto por Randle y colaboradores concluyó que la reducción en el transporte y la fosforilación de la glucosa en presencia de

los AGNE se debe a la competencia entre los AGNE y la glucosa como sustratos de la oxidación mitocondrial (92).

Recientemente se ha demostrado, que los AGNE plasmáticos inhiben el aumento de glucosa-6-fosfato intracelular dependiente de la insulina en el músculo esquelético humano durante la euglicemia-hiperinsulinemia (93, 94). Este efecto induce una disminución en la oxidación de la glucosa, en la biosíntesis de glucógeno y en el transporte de la glucosa (95). Estas anomalías se han detectado aún en presencia de AGNE a concentraciones fisiológicas (93), lo que sugiere que existe un mecanismo alterno para inducir la resistencia a la insulina en el músculo esquelético humano. Otro experimento similar al anterior ha demostrado una disminución de la glucosa libre intracelular, lo que sugiere que los AGNE pueden afectar el transporte de la glucosa dependiente de la insulina, reduciendo la fosforilación de la tirosina del receptor de insulina (IR- β) (96). La fosforilación del IR- β implica una cascada de señales que induce la translocación del transportador del GLUT4. El receptor de la insulina fosforilado activa la fosfatidilinositol-3cinasa involucrada en la translocación del GLUT4 (97) (Figura 8).

El mecanismo por el cual los AGNE afectan la cascada de estas señales del IR- β no está establecido. La concentración elevada de los AGNE incrementa el nivel de los triglicéridos y de los acil-CoA de larga cadena en el músculo (98) que podría modificar los niveles del diacilglicerol (DAG) conocido como un potente activador de las isoenzimas θ y ε de la Proteína cinasa C (PKC) involucradas en la señalización del transporte de la glucosa.

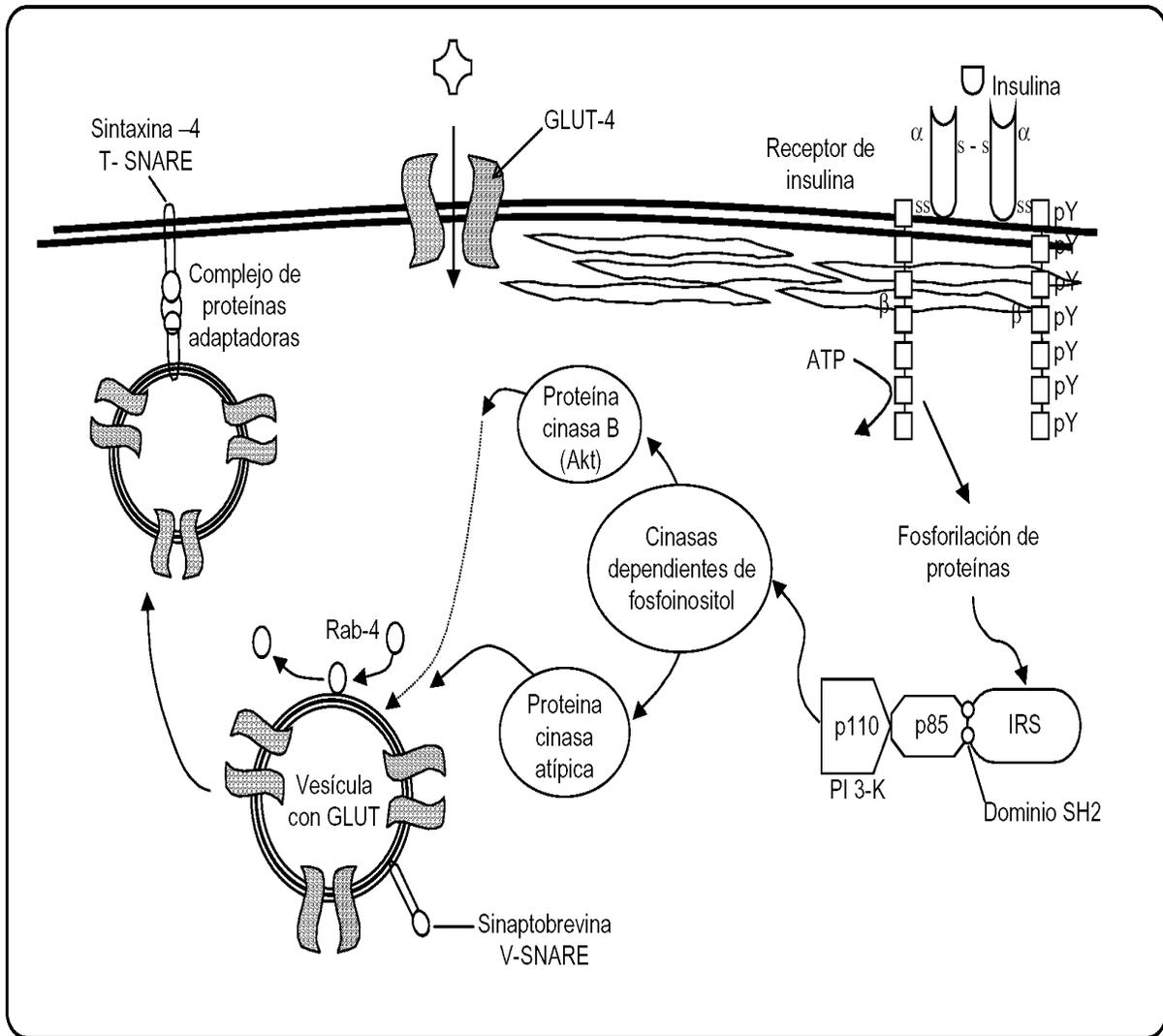


Figura 8. Ruta de señalización vía insulina para el control de la glucosa (72).

Otros autores sugieren que a una mayor oferta de AGNE, se incrementa la concentración de Acetil-CoA derivada de su oxidación mitocondrial, activándose una o más isoformas de PKC, y podrían activarse cinasas serina / treonina, que fosforilan al IRS-1, disminuyendo su actividad como sustrato para la actividad de la tirosina quinasa del receptor insulínico, mecanismo por el cual los AGNE generarían resistencia a la insulina (99) (Figura 9).

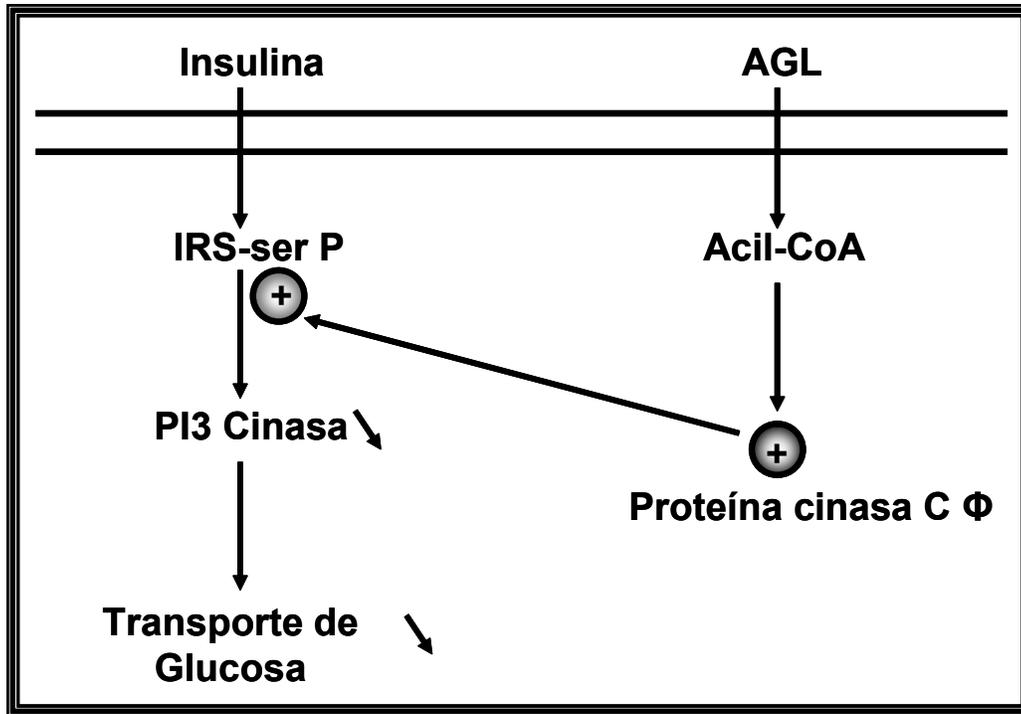


Figura 9. Posible mecanismo de acción de los AGNE reduciendo la sensibilidad del sustrato receptor de insulina (99).

1.8. AGNE Y ESTRÉS OXIDATIVO.

En un estudio realizado en células β -pancreáticas se evaluó el efecto del ácido oleico sobre diversas funciones celulares y se encontró que como desacoplante incrementa el estado 4 de la respiración mitocondrial, disminuye el ATP celular y finalmente altera la secreción de insulina inducida por glucosa (100); pero los efectos son más evidentes cuando son incubadas por períodos largos de tiempo con el ácido oleico (72 h). Así mismo, también se aprecia que la generación de H_2O_2 por mitocondrias aisladas de estas células es incrementada con la incubación previa con el ácido graso (100).

En ratas obesas se ha observado que el hígado desarrolla mecanismos para protegerse contra la acumulación de triglicéridos y AGNE que están probablemente implicados en el desarrollo de estrés oxidativo, sobre-expresando una proteína desacoplante (UCP-2) que normalmente no es constitutiva en hepatocitos, con lo cual se trata de evitar la formación de ERO por la mitocondria (101) al disminuir el potencial y favorecer el flujo de electrones independientemente de la síntesis de ATP.

Cocco (1999), ha encontrado que el ácido araquidónico y otros AGNE, en concentraciones micromolares, inhiben la actividad de los complejos I, I+III y III, y promueven la formación de ERO en mitocondrias aisladas de corazón de bovino (102).

1.8.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) han sido de interés por muchos años en todas las áreas de la biología.

El ambiente reductor celular favorece reducciones univalentes del oxígeno no programadas. Así, en un ambiente aeróbico, se produce el peróxido de hidrógeno, un radical anión superóxido y el radical hidroxilo, que es extremadamente reactivo, a los que se consideran responsables de la toxicidad del oxígeno (Tabla 2) (103). Para poder sobrevivir en este medio, los organismos vivos generan y obtienen del medio, compuestos antioxidantes solubles en agua o en lípidos. También sintetizan una serie de enzimas antioxidantes cuya función es interceptar e inactivar intermediarios reactivos del oxígeno. A pesar de su extrema

importancia, los compuestos y enzimas antioxidantes no son completamente efectivos para prevenir el daño oxidativo o estrés oxidativo (104).

El estrés oxidativo ha sido implicado en una gran variedad de procesos degenerativos, enfermedades y síndromes. Entre ellos están: las enfermedades de Parkinson y Alzheimer en el sistema nervioso central; las cataratas, degeneración macular, retinopatías del diabético y del prematuro, el asma, el cáncer pulmonar, el síndrome de dificultad respiratoria del adulto, la aterosclerosis, el infarto al miocardio, la hipertensión, la miocardiopatía, la hepatitis, la cirrosis hepática, la diabetes, la pancreatitis, cáncer de colon, colitis, etc. (105).

Tabla 2. Principales especies reactivas de oxígeno.

Especies Reactivas de Oxígeno	Fuentes principales
Oxígeno singulete (1O_2)	Absorción de energía por el O_2
Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	<u>Fuga de electrones de la cadena de transporte de electrones</u> Xantina oxidasa NADPH-oxidasa
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	A partir de $O_2^{\cdot-}$ vía superóxido dismutasa (SOD)
Radical Hidroxilo (OH^{\cdot})	A partir de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , vía metales de transición (Fe o Cu)
Oxido Nítrico (NO)	Sintetasa del óxido nítrico

1.8.2. ANTIOXIDANTES FISIOLÓGICOS.

Los antioxidantes son sustancias capaces de neutralizar la acción oxidativa de una molécula inestable (radical libre) sin perder su propia estabilidad electroquímica. Los antioxidantes son: depuradores de radicales libres, agentes reductores, frenadores de la formación del oxígeno singulete, el cual se forma cuando uno de los dos electrones libres o desapareados del O₂ capta energía y cambia su giro, cuando esto sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre y puede aceptar pares de electrones, lo que los hace muy reactivos. Esto permite controlar la reacción oxidativa y brindar protección. Entre los antioxidantes endógenos están las enzimas como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasa, glutatión reductasa y catalasa. Entre los exógenos están las vitaminas A, C y E (Tabla 3)(106).

Tabla 3. Principales defensas antioxidantes en las células.

PROTECCIÓN ANTIOXIDANTE		
Sistema Enzimático	Productos	Sistema No Enzimático
Superóxido dismutasas: Mn-SOD Cu/Zn-SOD Fe-SOD	H ₂ O ₂ + O ₂	Antioxidantes hidrofílicos: Glutatión (GSH) Vitamina C Metalotioneínas Ceruloplasmina
Catalasa	H ₂ O + O ₂	Antioxidantes hidrofóbicos: Vitamina E
Glutatión-peroxidasa	H ₂ O + GSSG	Carotenos Ubiquinonas (Q10)

1.8.3. ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS:

1.8.3.1. BUTIL-HIDROXI-TOLUENO (BHT).

El BHT es un antioxidante sintético utilizado ampliamente en la industria alimentaria. Es bien conocido como atrapador de radicales libres; su propiedad antioxidante reside en que interrumpe la cadena de reacciones oxidativas por radicales libres, esto lo realiza mediante la contribución del hidrógeno del grupo hidroxilo fenólico que presenta en su estructura química, formándose un radical libre estable que no inicia o propaga más la oxidación de lípidos.

1.8.3.2. N-TERT-BUTIL-A-FENILNITRONA (PBN)

Los compuestos nitrona presentan habilidad como atrapadores de radicales libres. PBN es una nitrona conocida como atrapadora de radicales libres, utilizada experimentalmente en modelos de estrés oxidativo, en los cuales ha mostrado con eficacia su propiedad antioxidante.

1.8.3.3. N-ACETIL CISTEÍNA (NAC)

N-Acetil cisteína, es la variante acetilada del aminoácido L-cisteína, es una excelente fuente de grupos sulfhidrilos (SH), y es convertida en el organismo en metabolitos capaces de estimular la síntesis de glutatión (GSH), promoviendo destoxificación y actuando directamente como atrapador de radicales libres. En la clínica ha sido utilizada por más de 30 años, primariamente como un mucolítico, pero además de la acción mucolítica, NAC ha sido utilizada en condiciones caracterizadas por disminución de GSH o estrés oxidativo (107).

1.9. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES DEL MODELO ANIMAL CON SÍNDROME METABÓLICO (SM).

En nuestro laboratorio, hemos desarrollado y caracterizado un modelo de rata Wistar hipertriglicéridémica (HTG) e hipertensa, mediante la administración de sacarosa comercial al 30 % en el agua de bebida durante un periodo de 20 semanas. Este modelo se caracteriza por alteraciones en la composición de los AGNE de varios tejidos, elevación de los niveles de triglicéridos e insulina en sangre; aumento de la presión sanguínea; y una importante acumulación de la grasa intra-abdominal, lo que sugiere la presencia del síndrome de resistencia a la insulina que a su vez se asocia a un incremento en el riesgo de enfermedad coronaria. Asimismo, el uso de azúcar comercial refleja el efecto que éste y productos similares con alto contenido de carbohidratos, pudieran tener en las poblaciones que los consumen a diario y en cantidades excesivas.

El modelo de rata con síndrome metabólico (SM) es una variante del modelo descrito por Reaven (108), en el cual las dietas con concentraciones altas de sacarosa o fructosa inducen hipertensión, hipertriglicéridemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en ratas. Este cuadro patológico es frecuentemente observado en la clínica. La caracterización de este modelo animal que se desarrolló en el laboratorio se ha realizado en partes y los principales hallazgos son los siguientes:

1.- La adición de glucosa al 30 % en el agua de bebida de ratas Wistar produce hipertriglicéridemia e hipertensión comparables a las encontradas por

otros autores que administraron los carbohidratos con el alimento sólido. En nuestro caso, tuvimos que prolongar el tiempo de tratamiento a 20 semanas para obtener diferencias significativas con respecto a los controles (29,109).

2- Estas ratas tratadas presentan hiperinsulinemia, la cual es capaz de inducir la liberación anormalmente elevada de endotelina, lo que contribuye a incrementar la presión arterial y antagonizar los efectos del óxido nítrico. Esta observación es congruente con la presencia de daño endotelial (110).

3- Cambios significativos en el metabolismo de los ácidos grasos (ácido araquidónico) y peroxidación con diferencias asociadas al género de los animales. Los machos presentan mayor susceptibilidad a la peroxidación lipídica que las hembras (111,112).

4- Alteración en la actividad de las enzimas de desaturación de los ácidos grasos sobre todo la $\Delta 5$ -desaturasa, enzima clave en la biosíntesis del ácido araquidónico precursor de las prostaglandinas que están implicadas en la regulación del tono vascular (113).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El consumo de sacarosa en el agua de bebida induce: un incremento en los AGNEs, hiperinsulinemia y acumulación de la grasa en la cavidad intra-abdominal; que refleja resistencia a la insulina en diferentes órganos cuyo transporte de glucosa es totalmente o parcialmente sensible a insulina tales como el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado. El hígado, órgano responsable de regular la homeostasis metabólica es muy sensible a cambios en el metabolismo de los lípidos como la acumulación de AGNEs inducida por dietas hipercalóricas. Sin embargo, el mecanismo probable por el cual la alta concentración de los AGNEs, inducida por el alto consumo de sacarosa, afecta la sensibilidad del receptor de la insulina es aún materia de investigación en el hígado y otros órganos en el síndrome metabólico. El proyecto que realizamos consistió en investigar el efecto de los AGNEs circulantes sobre la sensibilidad del receptor de la insulina en hígado como en hepatocitos aislados del modelo con SM en comparación con los de animales controles. Determinamos la participación de las especies reactivas de oxígeno inducidas por los AGNEs sobre la fosforilación del receptor de la insulina, etapa clave en el transporte de glucosa sensible a insulina a través de la membrana plasmática.

3. HIPÓTESIS

Los AGNE circulantes reducen el grado de la fosforilación del receptor de la insulina (IR- β) en el hígado mediante un mecanismo que implica estrés oxidativo inducido por generación intracelular de radicales libres.

4. OBJETIVO GENERAL.

Elucidar un posible mecanismo por el cual los AGNE presentes en concentraciones elevadas, en un modelo experimental de síndrome metabólico, pueden contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina en los animales con una dieta alta en sacarosa, afectando el grado de fosforilación de IR- β e IRS-1.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES:

a). Determinar el grado de fosforilación basal del receptor de insulina (IR- β) y del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1), *in vivo* en hígado de ratas control y alimentadas con una dieta alta en sacarosa (SM).

b). Evaluar el efecto del ácido oleico como AGNE sobre el grado de fosforilación del (IR- β) y el IRS-1, *in vivo* en presencia de N-acetil-cisteína como antioxidante.

c). Elucidar el posible mecanismo por el cual los AGNE inducen estrés oxidativo en hepatocitos aislados de animales control y con SM.

5. METODOLOGÍA

5.1. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES.

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar machos recién destetadas y se distribuyeron al azar en dos grupos. Grupo 1, ratas a las que se les indujo el síndrome metabólico mediante una dieta alta en sacarosa, administrando sacarosa comercial al 30% en el agua de bebida durante un periodo de 20 semanas. Grupo 2, ratas con las mismas características que las del grupo 1 fueron utilizadas como control y recibieron agua sin sacarosa. Ambos grupos recibieron alimento sólido para roedores. Las ratas tuvieron libre acceso al alimento sólido y al agua de bebida. Se dejaron en ayuno durante 12 horas antes de sacrificarlas.

5.2 DETECCIÓN DE RESISTENCIA A LA INSULINA (PINZA EUGLICÉMICA-HIPERINSULINÉMICA).

La resistencia a la insulina se determinó por el método directo de la pinza euglicémica-hiperinsulinémica (114). El experimento se realizó en animales control y con SM los cuales fueron operados para la inserción de los catéteres un día anterior a la realización de la pinza. Los catéteres de calibre PE50 se insertaron en las dos venas yugulares para infusión de glucosa y de insulina, y otro catéter en la carótida para colectar sangre y medir glucosa por medio de un glucómetro que utiliza tiras reactivas(Roche). Por medio de una bomba peristáltica de alta precisión se realizó la infusión de la insulina por la yugular derecha a un flujo constante de 18 mU insulina/ Kg de peso corporal/ min. La solución de glucosa al 34% fue administrada a los animales por medio de otra bomba peristáltica de alta

precisión y por la yugular izquierda. En esta técnica, la infusión de insulina a alta concentración (hiperinsulinemia) incrementa la internalización de la glucosa circulante a tejidos sensibles a insulina e inhibe la producción de glucosa endógena por el hígado. La disminución de glucosa en plasma es prevenida por un flujo variable de una solución de glucosa. La cantidad de glucosa exógena requerida para mantener la glucosa plasmática en un nivel inicial es cuantificada por la velocidad de infusión de glucosa (VIG). VIG es una medición de la capacidad de la insulina para incrementar la internalización de la glucosa y supresión de la producción de glucosa, es decir es una medida de la sensibilidad del tejido a la insulina en cada animal.

Se tomó una muestra de sangre en ayuno para tener un valor inicial, de glucosa e insulina y después de un periodo de adaptación de 10 minutos se tomó otra muestra de sangre para medir los niveles de insulina y glucosa. La euglicemia fue mantenida en una relación variable de infusión de glucosa que fue ajustada de acuerdo a la determinación de glucosa plasmática en intervalos de 10 minutos durante dos horas de la pinza.

5.3. OBTENCIÓN DE PLASMA.

La sangre se colectó de la aorta abdominal en presencia de anticoagulante (EDTA al 0.1%), evitando la hemólisis. La muestra fue centrifugada inmediatamente a 3000 rpm, 20 minutos a 4° C, se separó el plasma y se le adicionó BHT al 0.002% como antioxidante. Se almacenó a -75°C hasta la determinación de los lípidos e insulina.

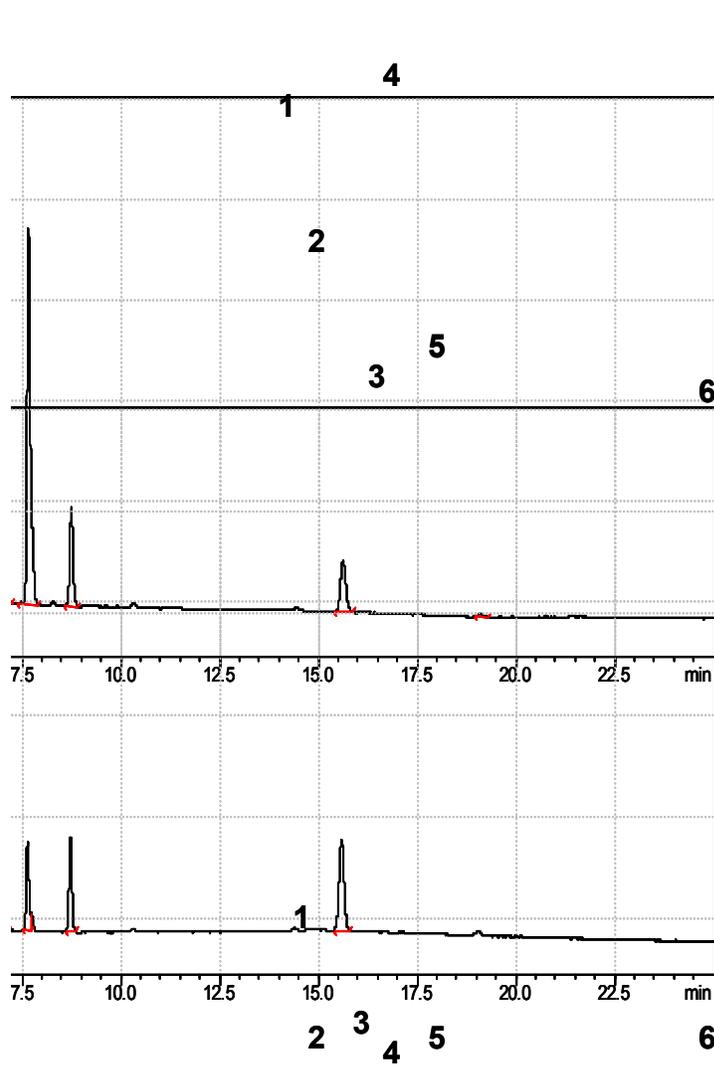
5.3.1. DETERMINACIÓN DE TRIACILGLICEROLES E INSULINA EN PLASMA.

Los triacilgliceroles fueron determinados de acuerdo al método descrito por Nägele (115) mediante una técnica enzimática, utilizando un blanco de muestra, en el autoanalizador ABBOTT UP Serie II (Irving, Texas, USA).

La insulina se determinó utilizando el método de radioinmuno-análisis con un kit comercial Coat-a-Count (Diagnostic Products, L. A. California, USA). Ambas determinaciones se realizaron en el Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

5.3.2. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS EN PLASMA E HÍGADO.

El análisis y la cuantificación de los ácidos grasos no esterificados en plasma e hígado se realizó por cromatografía de gases. Los ácidos grasos se extrajeron según el método de Folch (116) utilizando una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) en presencia de BHT al 0.002% como antioxidante y utilizando el ácido heptadecanoico (C17:0) como estándar interno. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron preparados por esterificación en presencia de 100 μ L de 2,2 dimetoxipropano y 2% de H₂SO₄ concentrado durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por adición de piridina.



A

B

Figura 10. Esquema representativo del análisis cromatográfico de los diferentes tipos de ácidos grasos en una muestra de plasma: 1. palmítico, 2. palmitoleico, 3. esteárico, 4. oleico, 5. linoleico, 6. araquidónico. A) rata SM y B) rata Control.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se extrajeron con hexano y posteriormente las muestras se evaporaron con nitrógeno (N₂) (117). Los ésteres metílicos se analizaron con un cromatógrafo de gases equipado con una columna capilar SP-2330 de 30 m de largo a 190°C durante 35 minutos, con helio como gas acarreador.

La Figura 10 muestra un cromatograma con los diferentes tiempos de retención en minutos a los cuales se detectaron los ácidos grasos presentes en una muestra plasmática de un animal control y uno con SM.

5.4. OBTENCIÓN DE HOMOGENEIZADO DE HÍGADO.

Se utilizó el método descrito por Bezerra (118). Las ratas del grupo 1 y grupo 2, se anestesiaron con pentobarbital sódico (80 mg/Kg de peso) intraperitoneal. La cavidad abdominal fue abierta, se expuso la vena porta y se le inyectó 100 µL de insulina (10 UI/mL). Dentro de los siguientes 30 segundos, fue removida una pequeña porción de hígado (500 mg) y homogeneizada utilizando un homogeneizador manual en presencia de 1 mL de buffer de solubilización (Tritón X-100 10 µL/mL, Tris 100 mM pH 7.4, pirofosfato de sodio 100 mM, fluoruro de sodio 100 mM, EGTA 2 mM, ortovanadato de sodio 10 mM, PMSF 2 mM, aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL y pepstatina 10 µg/mL) a 4°C. El homogeneizado de hígado fue centrifugado a 16,000 g a 4°C por 20 minutos para remover el material insoluble y el sobrenadante fue almacenado a -75°C para los ensayos de inmunoprecipitación.

Para determinar la respuesta del receptor de insulina en presencia de un AGNE (AO) se estimuló la fosforilación del mismo con insulina humana (Humulin, Eli Lilly) durante 30 segundos y enseguida se tomó la muestra como se indicó en el párrafo anterior. Para estos ensayos los animales control y con SM fueron divididos en 4 subgrupos según su tratamiento:

- 1) BSA
- 2) BSA+Insulina
- 3) BSA+AO+Insulina
- 4) NAC+BSA+AO+Insulina

El AO, NAC y BSA se administraron vía vena caudal, y se espero su efecto durante 20 minutos cada uno.

5.4.1. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE FOSFORILACIÓN DE IR- β E IRS-1 POR INMUNOPRECIPITACIÓN Y ELECTROFORESIS.

La detección de la fosforilación de las proteínas IR- β e IRS-1 en sus residuos de tirosina, se realizó por medio de inmunoprecipitación, electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia. Para inmunoprecipitar las proteínas se incubaron 5 mg de proteínas totales del homogeneizado de hígado con 5 μ g del anticuerpo monoclonal antifosfotirosina (clona PY20, Sigma-Aldrich Co.), se mantuvo con agitación suave a 4°C toda la noche, seguido de la adición de la proteína A (Sigma-Aldrich Co.) durante 2 horas, posteriormente el homogenizado fue centrifugado a 16000 x g durante 3 minutos, se desechó todo el sobrenadante y el botón que contenía el inmunocomplejo se lavó tres veces con PBS a 4°C. Las

proteínas inmunoprecipitadas se trataron con 50 μ L de buffer de Laemmli 2X (40 mM Tris y 1% SDS) (86) que contenía 100 mmol/L de DTT. Las muestras se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos y se depositaron en un gel SDS-PAGE al 10 % en una cámara de minigeles Bio-Rad, se corrieron las muestras durante 150 minutos a 120 V. La electrotransferencia de las proteínas del gel a la membrana de PVDF (tamaño del poro 0.45 mm, Millipore Corporation) se realizó a 350 mA durante 120 minutos (agitación constante), en la cámara de transferencia de Bio-Rad (118). Al buffer se le adicionó 0.02% de SDS para aumentar la transferencia de las proteínas de alto peso molecular. La unión no-específica de proteínas a la membrana fue bloqueada preincubando la membrana durante toda la noche a 4°C en una solución que contenía 50 g/L de leche descremada en polvo, PBS (136 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄) más 0.1% (v/v) Tween-20. La membrana PVDF se incubó con los anticuerpos policlonales contra IR- β e IRS-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una dilución de 1:5000 en solución bloqueadora (30 g/L de leche sin grasa en polvo seco, PBS y 0.1% Tween 20) durante 12 horas a 4°C con agitación suave. El lavado de la membrana se hizo tres veces con una solución sin leche durante 10 minutos con agitación suave. Como anticuerpo secundario, se utilizó anti-IgG de conejo acoplado con peroxidasa a una dilución de 1:2500 en solución bloqueadora, incubando durante 12 horas a 4°C con agitación suave. Enseguida, la membrana fue lavada con solución bloqueadora sin leche durante 10 minutos y dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS); las proteínas fueron reveladas por quimioluminiscencia con un kit que contenía luminol (Santa Cruz

Biotechnology, Inc) (119). Las bandas obtenidas correspondieron a las proteínas buscadas IR- β (95 kDa) e IRS-1(197 kDa). Como marcadores de peso molecular se emplearon los estándares de proteínas para SDS-PAGE (Bio Rad Laboratorios Richmond, CA). Los autorradiogramas fueron analizados por medio de densitometría en un analizador de imagen UVP (Inc, Upland, CA, USA).

5.4.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método modificado de Lowry (120). Se utilizaron 10 μ L de muestra y se realizó una dilución (1:100, v/v) en solución salina al 0.9 % de NaCl, de la dilución se tomaron 100 μ L de la muestra por duplicado. Luego se preparó una mezcla de soluciones que contenía 10 mL de NaOH 0.1 N en NaHCO₃ al 1% más 50 μ L de tartrato de sodio y potasio al 1% más 50 μ L de sulfato cúprico al 0.05 %, de esta mezcla se adicionó 1 mL a cada tubo de muestra y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó 50 μ L del reactivo de Folin 1 N, incubando las muestras por 30 minutos. Las lecturas se realizaron a 750 nm en el espectrómetro de UV/Visible. Para la curva de calibración se utilizó como estándar albúmina de suero bovino (BSA) a 1 μ g/ μ L.

5.5. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS.

Se utilizó el método modificado de Berry y Friend, 1979 (121). La perfusión del hígado se realizó con tres soluciones amortiguadoras Krebs Ringer-HEPES a pH 7.4 de la siguiente composición:

	A	B	C
HEPES	25 mM	25 mM	25 Mm
NaCl	115 mM	115 mM	115 Mm
KCl	5 mM	5 mM	5 Mm
KH₂PO₄	0.9 mM	0.9 mM	0.9 mM
MgSO₄	1.2 mM	-----	1.2 mM
EGTA	0.5 mM	-----	-----
CaCl₂	-----	1 mM	2 mM
Colagenasa Tipo IV (Sigma)	-----	0.025 %	-----
BSA	-----	-----	1 %

Las soluciones A y B se mantuvieron en baño maría a 42° C, ambas soluciones fueron aeradas con 95 % de O₂ y 5% de CO₂.

La rata se anestesió con pentobarbital sódico (80 mg/Kg de peso) vía intraperitoneal, se le realizó una disección en piel y músculos de la parte superior del abdomen y se procedió a exponer la vena porta, se colocó una ligadura alrededor de la vena haciéndole un nudo suave, se le hizo una pequeña incisión y se le introdujo una cánula. Una vez que se sujetó la cánula, se procedió a pasar la solución A a un flujo de 30 mL/minuto durante 5 minutos, enseguida se realizó un corte en la vena cava inferior (a nivel del riñón) para que la solución drenara libremente. La ausencia de sangre se verificó observando palidez en el hígado, éste se disecó y se colocó en un embudo, se detuvo el flujo de la solución A, y se inicio la perfusión de la solución B a 20 mL/min durante 20 minutos; enseguida se detuvo el flujo de colagenasa y se colocó al hígado en una caja petri que contenía la solución amortiguadora C con BSA, donde se procedió a quitar con pinzas de disección la cápsula de Glisson (tejido conectivo externo) para liberar las células a

la solución. Posteriormente esta suspensión fue filtrada a través de una malla de nylon y el filtrado se centrifugó a 120 x g en una centrífuga clínica (International Equipment Co., Boston Mass.) durante 2 minutos, esta operación se repitió dos veces más; al finalizar los lavados, las células se resuspendieron en PBS pH 7.0, manteniéndolas en hielo.

5.5.1. INCORPORACIÓN INTRACELULAR DEL DCF-DA EN HEPATOCITOS.

El marcado de los hepatocitos se realizó por el método descrito por Qu B, et al, 2001 (122). Los hepatocitos fueron incubados con el fluoróforo diacetato de 2',7'diclorodihidrofluoresceína (DCF-DA) indicador de la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO).

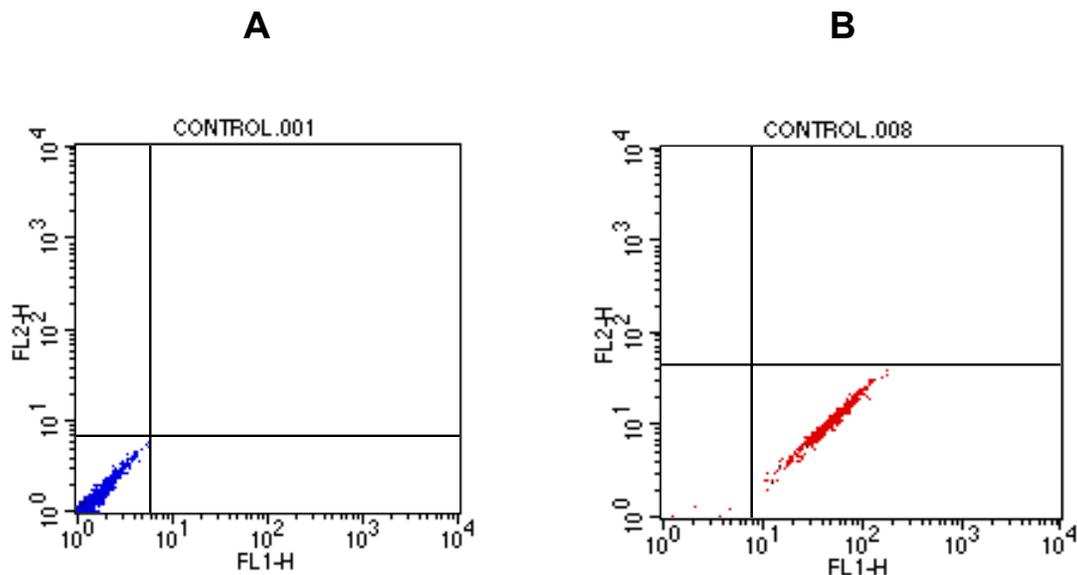


Figura 11. Trazos representativos de la fluorescencia emitida por los hepatocitos; A) fluorescencia basal y B) fluorescencia emitida cuando las células están marcadas con DCF-DA 10 μ M.

La membrana plasmática puede ser atravesada por el DCF-DA, por sus características lipofílicas; intracelularmente, por medio de esterasas no específicas, los grupos acetato se hidrolizan para dar DCF, que es muy sensible a la oxidación (al reaccionar con oxidantes intracelulares), el DCF oxidado se detecta por fluorescencia en un citómetro de flujo FACS Calibur Benton Dickinson (San José CA, USA) a una longitud de onda de 488 nm de emisión y 575 nm de excitación. La fluorescencia detectada en cada ensayo correspondió a la fluorescencia emitida por 1000 células (Figura 11).

Las células (1×10^6 células/mL) fueron cargadas con 10 μ M de DCF-DA disuelto en DMSO, se mantuvieron en incubación y agitación suave durante 20 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad, posteriormente se realizaron dos lavados con solución PBS pH 7.4 y se recuperaron por centrifugación a 120 x g, durante 2 minutos. Las células se resuspendieron en PBS y se conservaron en hielo hasta su utilización.

5.5.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN HEPATOCITOS.

Las pruebas se llevaron a cabo según los métodos utilizados por Leal AM (123) y Qu B (122) con algunas modificaciones. Todos los ensayos se realizaron por citometría de flujo en PBS pH:7.0 a 37°C. En cada ensayo se analizó la fluorescencia emitida por 1,000 células marcadas con DCF-DA 10 μ M y fijadas con paraformaldehído. Para obtener una curva dosis-respuesta de la generación de radicales libres (ERO) en presencia del ácido oleico, las células fueron preincubadas con diferentes concentraciones de ácido oleico (0, 10, 40, 80, 100

μM) durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y en oscuridad. Los siguientes ensayos se realizaron preincubando los hepatocitos marcados durante 20 minutos a temperatura ambiente y agitación suave con cloruro de difeniliodonio (DPI) $1 \mu\text{M}$ que es un inhibidor del complejo NADPH oxidasa (124). Enseguida, estas células se incubaron en presencia o ausencia de ácido oleico $100 \mu\text{M}$, que es la concentración a la cual se obtuvo una mayor generación de ERO, durante 20 minutos.

Para conocer si también había generación de estrés oxidativo a nivel mitocondrial en estos hepatocitos aislados, se realizaron pruebas preincubando las células en presencia de ácido oleico $100 \mu\text{M}$ más Rotenona $10 \mu\text{M}$, que es un bloqueador del Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, analizando su efecto sobre la generación de estrés oxidativo.

5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se presentan como el promedio de diferentes experimentos \pm desviación estándar. El número de experimentos se indica abajo de cada gráfico o tabla indicando los resultados. Los gráficos y los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SigmaPlot versión 7 (Gendel Corporation, 1995). Las comparaciones entre los experimentos control y los experimentos en presencia de los diferentes compuestos estudiados, se realizaron aplicando la prueba t de Student para identificar las diferencias significativas. Las diferencias entre diferentes grupos de experimentos son significativas cuando la $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES.

El tratamiento de las ratas Wistar con sacarosa durante 20 semanas indujo una mayor acumulación de grasa intra-abdominal, un aumento en la concentración de los triacilgliceroles en comparación con los animales control. La concentración de insulina fue significativamente más alta en el grupo con SM que en el control. En cuanto al peso corporal y la concentración de glucosa no se observó diferencia significativa entre los dos grupos (Tabla 4).

Tabla 4. Características generales de los grupos.

Variables	Control	SM
Peso corporal (g)	448 ± 12	445 ± 10
Grasa intra-abdominal (g)	4.3 ± 0.8	14.8 ± 4**
Triacilgliceroles (mM)	0.9 ± 0.2	1.4 ± 0.3*
Glucosa (mM)	6.9 ± 2.1	6.2 ± 0.9
Insulina (pM)	106.8 ± 17.4	285.2 ± 53.5**

Los valores son expresados como la media ± DE de 6 animales diferentes. Diferencia significativa del grupo control contra SM, *p<0.01, **p<0.001.

6.2. PINZA HIPERINSULINÉMICA-EUGLICÉMICA

La figura 12 muestra la variación de la velocidad de infusión de la glucosa ($\mu\text{mol/Kg/min}$) en función del tiempo (min) con una velocidad constante de infusión

de insulina. Durante los primeros 20 minutos la velocidad de infusión de la glucosa aumentó de una manera similar en los dos grupos. Entre 20 y 40 minutos la velocidad de infusión de glucosa aumentó mucho más en los animales control que en los animales SM. Después de 40 minutos la velocidad de infusión llegó a un nivel donde la variación fue mínima durante 80 minutos. Se observó que los animales control necesitan una mayor velocidad de infusión de la glucosa que los animales con SM.

6.3. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS.

La Tabla 5 muestra que la concentración total de AGNE plasmáticos fue significativamente más alta ($p < 0.001$) en el grupo con SM en comparación con el grupo control (Tabla 5). Este aumento en la concentración total de los AGNE resulta del aumento significativo en la concentración del ácido oleico ($p < 0.001$), el palmítico y palmitoleico. El ácido esteárico no sufrió cambio significativo en ninguno de los grupos, mientras que el ácido linoleico y araquidónico disminuyeron en el grupo SM.

La concentración de AGNE en homogeneizado de hígado, presentó un incremento significativo en la concentración total de AGNE ($p < 0.001$) en el grupo SM en comparación con el grupo control. En la composición de los AGNE presentes en el hígado se encontró un aumento significativo en el ácido oleico ($p < 0.001$) y palmitoleico ($p < 0.01$) del grupo SM (Tabla 6).

PINZA HIPERINSULINÉMICA-EUGLICÉMICA

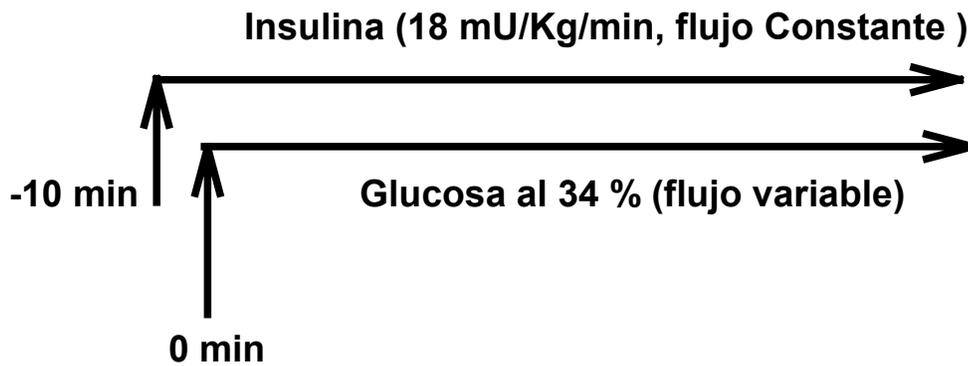
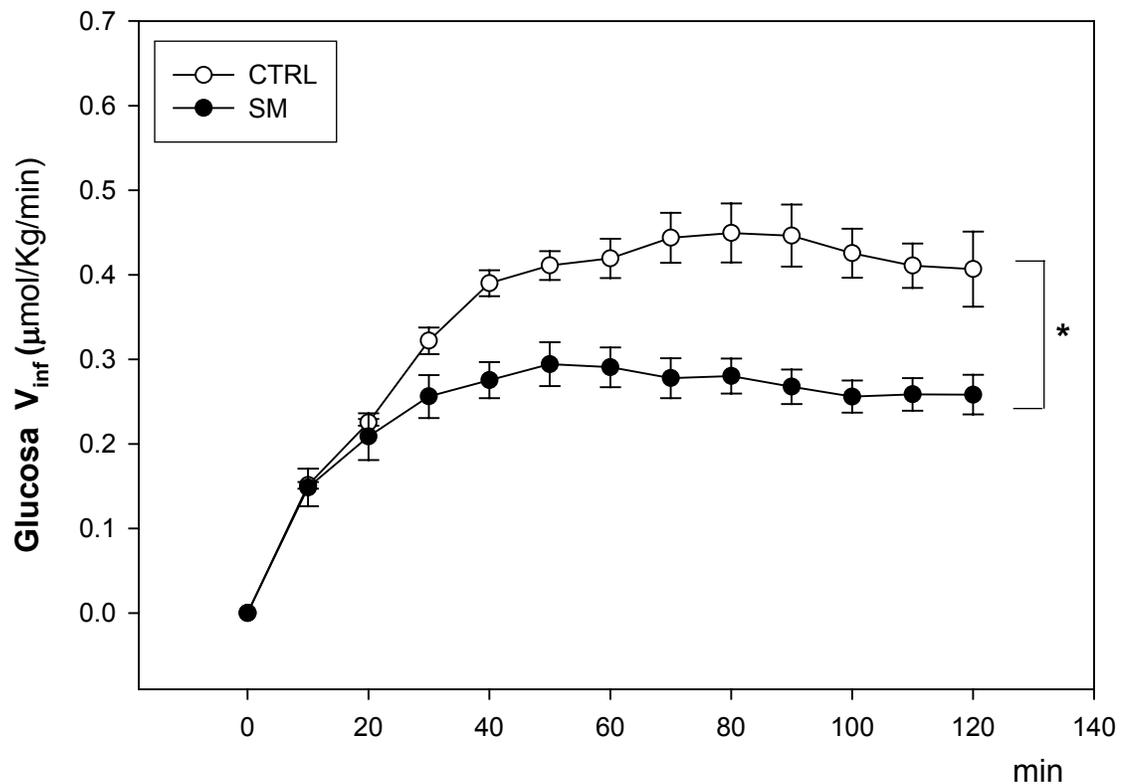


Figura 12. Resistencia a la insulina en ratas SM. Método de la pinza euglicémica-hiperinsulinémica. Los resultados son expresados como velocidad de infusión de glucosa. Cada punto en la curva representa la media \pm DE de 6 experimentos.

* $p < 0.001$ a partir de los 40 minutos.

Tabla 5. Concentración de AGNE en plasma (mM).

Ácidos grasos	Control	SM
Palmítico	0.22 ± 0.02	0.39 ± 0.06**
Palmitoleico	0.02 ± 0.01	0.18 ± 0.06***
Estéarico	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Oleico	0.15 ± 0.02	0.32 ± 0.06***
Linoleico	0.14 ± 0.02	0.10 ± 0.02*
Araquidónico	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.01*
Total	0.68 ± 0.07	1.11 ± 0.09***

Los valores son expresados como la media ± DE de 8 animales diferentes. Diferencia significativa del grupo control contra grupo SM, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Tabla 6. Concentración de AGNE en hígado (µmol/mg de proteína).

Ácidos grasos	Control	SM
Palmítico	29.8 ± 15.3	35.8 ± 6.1
Palmitoleico	0.6 ± 0.57	6.3 ± 2.1**
Estéarico	12.2 ± 3.8	13.3 ± 2.4
Oleico	11.1 ± 6.5	32.1 ± 8.5**
Linoleico	14.3 ± 8.4	17.9 ± 6.4
Araquidónico	10.2 ± 5.6	11.9 ± 3.7
Total	78.5 ± 11.4	117.5 ± 27.6**

Los valores son expresados como la media ± DE de 8 animales diferentes. Diferencia significativa del grupo control contra grupo SM, **p<0.001.

6.4. CUANTIFICACIÓN BASAL DEL RECEPTOR DE INSULINA (IR- β) Y DEL SUSTRATO 1 RECEPTOR DE INSULINA (IRS-1) EN HOMOGENEIZADO DE HÍGADO.

Por medio de electroforesis con SDS-PAGE y Western blot, se analizó el contenido basal del receptor IR- β y el sustrato IRS-1 en los homogeneizados de hígado utilizando anticuerpos policlonales anti-IR- β y anti-IRS-1. El análisis por densitometría de las bandas que corresponden a cada proteína en las placas radiográficas escaneadas, no mostró diferencias en la densidad óptica entre el grupo con SM y el control en ambas proteínas (Figura 13).

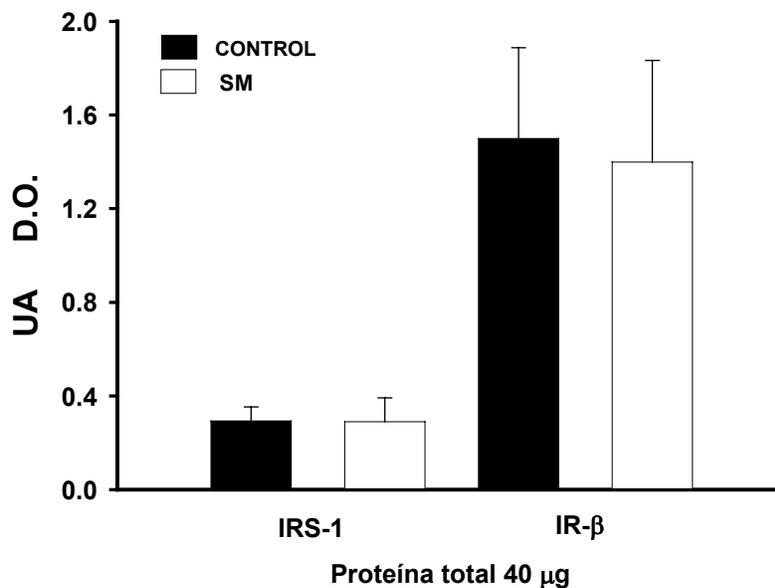


Figura 13. Análisis de la expresión de IR- β e IRS-1 en homogeneizado de hígado en animales control y SM. La cantidad total de IR- β e IRS-1 son expresados en unidades arbitrarias de densidad óptica. Cada barra representa la media \pm DE de 6 animales diferentes.

6.5. FOSFORILACIÓN DE TIROSINAS EN IR- β E IRS-1.

La determinación del grado de fosforilación del IR- β e IRS-1 en sus residuos de tirosina se realizó en presencia de insulina, en homogeneizado de hígado. Los tejidos lisados (5 mg/mL proteína total) fueron sometidos a inmunoprecipitación con el anticuerpo antifosfotirosina y las proteínas precipitadas fueron separadas en geles de acrilamida SDS-PAGE al 10% y detectadas utilizando anticuerpos anti-IR- β y anti-IRS-1. Para cuantificar la fosforilación del receptor de insulina y de IRS-1 los autorradiogramas fueron analizados en un densitómetro, como se describe en la metodología. La figura 14 muestra un autorradiograma de la proteína buscada en muestras de hígado control y SM.

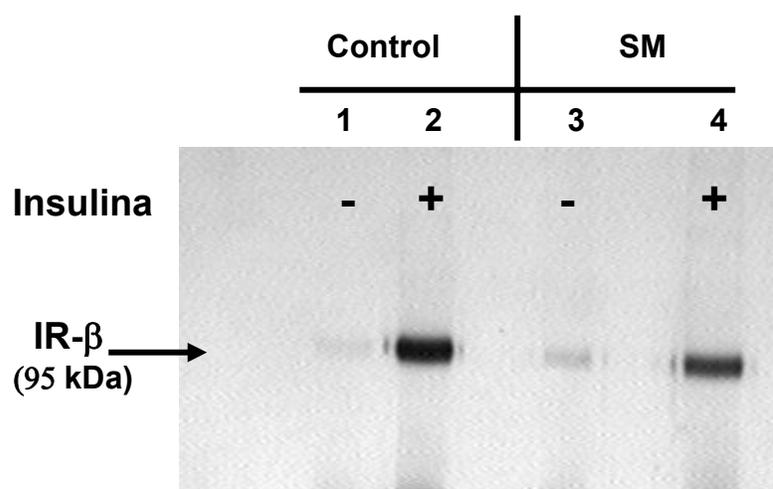


Figura 14. Detección del receptor de insulina (IR- β) en muestras de homogeneizado de hígado en presencia o ausencia del estímulo con insulina. Autorradiograma representativo de un Western blot.

6.5.1. FOSFORILACIÓN DEL IR- β .

La densidad óptica (D.O.) obtenida de las bandas en las muestras control y que corresponden al IR- β sin el estímulo de insulina (grupo BSA, figura 15) se consideró como el 100 % de D.O.

La fosforilación inicial del IR- β sin estímulo de insulina en el grupo SM fue significativamente más baja ($p < 0.001$) que en el grupo control. En el grupo BSA+Ins después de los 30 segundos de estimulación con insulina, el porcentaje de fosforilación del IR- β aumentó de manera significativa $p < 0.001$ en ambos grupos de animales (Figura 15).

El tratamiento con AO de los animales control y SM, disminuyó significativamente el grado de fosforilación del IR- β (% D.O) en ambos grupos de ratas (grupo BSA+AO+Ins, Figura 15). Para investigar si el efecto del AO sobre la fosforilación del receptor de insulina implica la generación de ERO (estrés oxidativo) se administró el antioxidante N-acetil cisteína (NAC) durante 20 minutos antes de administrar el AO en los animales, lo que nos muestra la protección del nivel de fosforilación del IR- β tanto en el grupo control como en el grupo SM (grupo NAC+BSA+AO+Ins, Figura 15), lo anterior nos indica que el antioxidante NAC previene contra el estrés oxidativo inducido en el hígado por los AGNE (ácido oleico) en tiempos cortos, afectando los niveles de fosforilación del receptor de insulina.

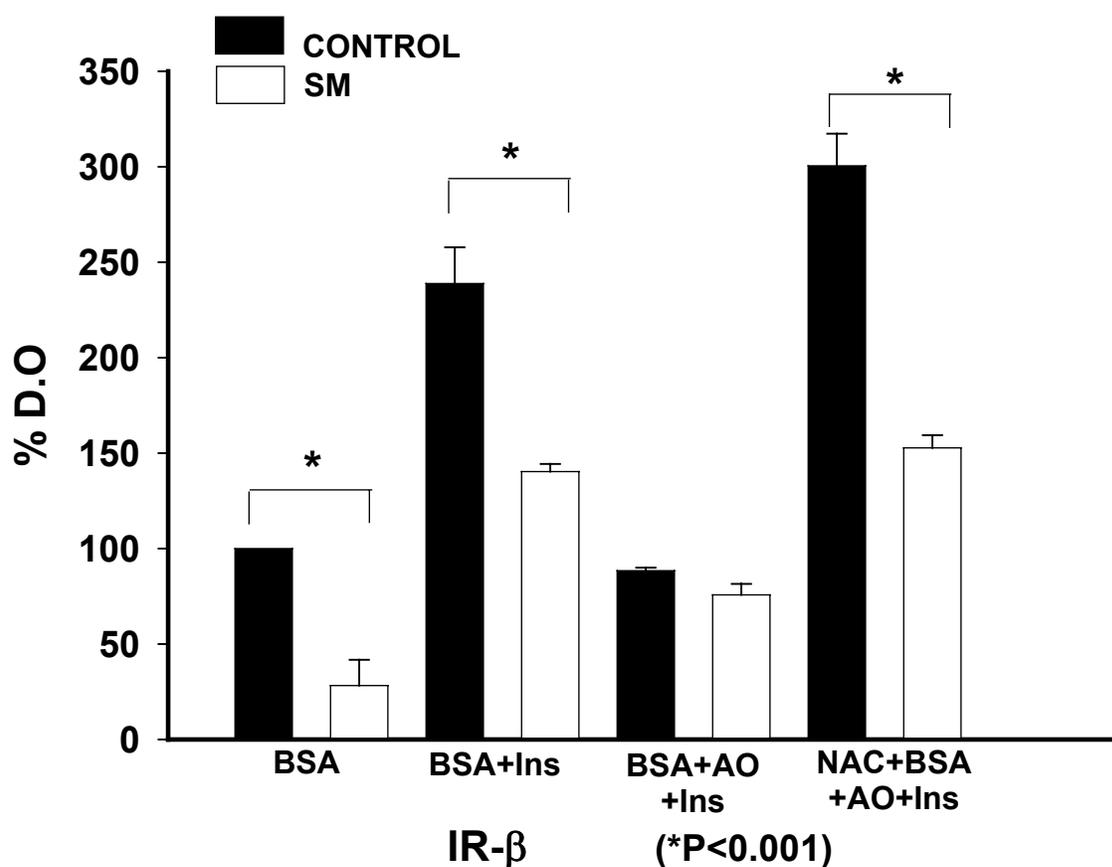


Figura 15. Fosforilación del receptor de insulina (IR-β) en homogeneizado de hígado de ratas control y SM; sacrificadas 30 segundos después de recibir 10 UI/mL de insulina vía intravenosa. En el grupo BSA las ratas control y SM no recibieron insulina. Cada barra del gráfico representa la media ± desviación estándar de 6 experimentos.

6.5.2. FOSFORILACIÓN DEL IRS-1.

La figura 16 muestra el porcentaje de D.O. que corresponde al nivel de fosforilación de IRS-1. En los animales con SM el porcentaje de D.O es significativamente menor ($p < 0.05$) que en el grupo control (sin estímulo con insulina, grupo BSA), lo que nos indicó que este segundo componente de la cascada de señalización para el transporte de glucosa se ve afectado

probablemente por la presencia incrementada de AGNE circulantes en este modelo animal. Con el estímulo de insulina la fosforilación del IRS-1 fue incrementada significativamente en ambos grupos de ratas ($p < 0.05$) (grupo BSA+Ins, Figura 16).

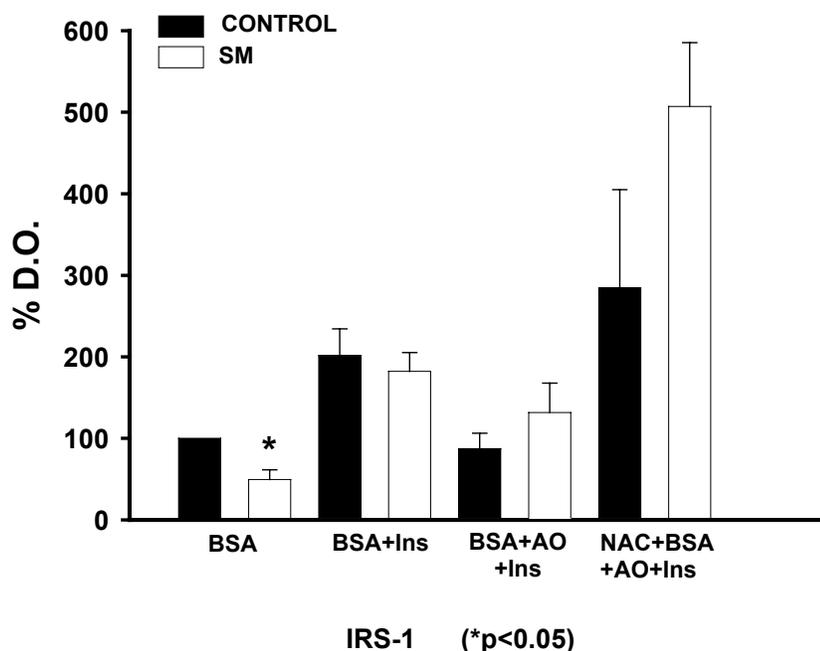


Figura 16. Fosforilación del sustrato receptor de insulina 1 (IRS-1) en homogeneizado de hígado, de ratas control y SM; sacrificadas 30 segundos después de recibir 10 UI/mL de insulina vía intravenosa. En el grupo BSA las ratas control y SM no recibieron insulina. Cada barra representa la media \pm desviación estandar de 6 animales diferentes.

El tratamiento con AO tanto en el grupo control y el grupo SM disminuyó el porcentaje de fosforilación de IRS-1, pero este cambio no fue significativo en ambos grupos de ratas (grupo BSA+AO+Ins, Figura 16). La presencia del antioxidante NAC antes del tratamiento con AO aumentó la fosforilación de esta

proteína de manera significativa ($p < 0.05$) en el grupo SM, pero no modificó la respuesta en el grupo control con respecto al grupo control tratado sólo con AO (grupo NAC+BSA+AO+Ins, figura 16).

6.6. EFECTO DEL ÁCIDO OLEICO SOBRE LA GENERACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO EN HEPATOCITOS AISLADOS DE RATAS CONTROL Y RATAS SM.

Se realizaron experimentos para la generación de ERO en hepatocitos aislados de ambos grupos de animales, con el objetivo de investigar si el AO induce estrés oxidativo el cual esté afectando la fosforilación del receptor de insulina.

Para determinar la generación intracelular de ERO, los hepatocitos se marcaron con DCF-DA, una sonda fluorescente indicadora de estrés oxidativo, como se mencionó en la metodología.

La Figura 17 es un histograma representativo de la fluorescencia emitida por hepatocitos control marcados y posteriormente tratados con AO, la escala utilizada en el eje de las "x" es logarítmica, lo que se observó es un importante desplazamiento de la fluorescencia, en presencia de 100 μM de ácido oleico.

La Figura 18 muestra el efecto dosis-respuesta del AO sobre la intensidad de la fluorescencia del DCF en los hepatocitos aislados de animales control y SM. La intensidad de fluorescencia generada por los hepatocitos control en ausencia de AO fue de 23.4 UA.

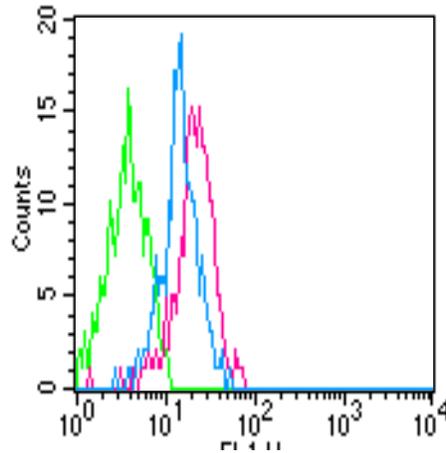


Figura 17. Histograma representativo de la fluorescencia emitida por hepatocitos de rata control por citometría de flujo. Histograma color verde representa la fluorescencia basal de las células, el color azul es fluorescencia en presencia de DCF-DA 10 μ M, el color rosa en presencia de AO 100 μ M.

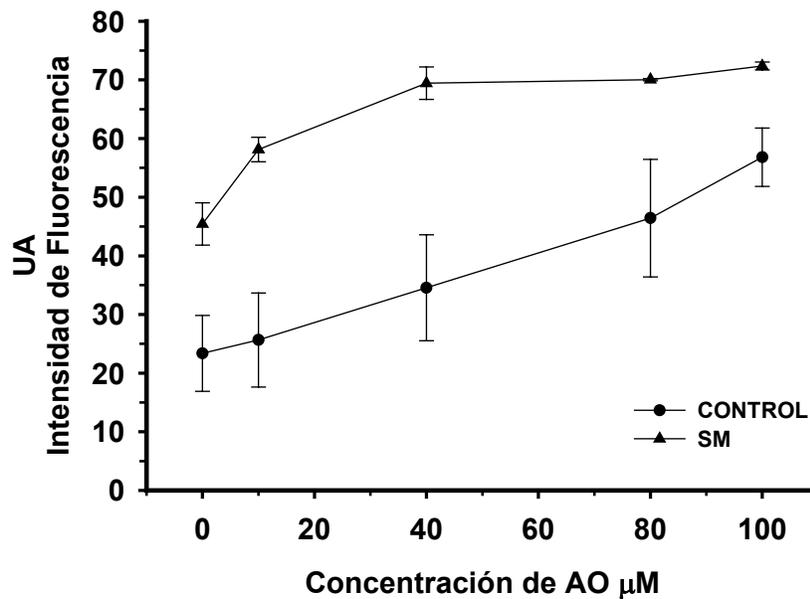


Figura 18. Generación de estrés oxidativo en presencia de AO a diferentes concentraciones (0, 10, 40, 80 y 100 μ M), en hepatocitos de ratas control marcados con DCF-DA. Cada punto corresponde a la media \pm desviación estandar de n= 5 animales diferentes.

En hepatocitos de ratas SM la respuesta no fue lineal (Figura 18) como en las células control; la fluorescencia emitida por estas células fue significativamente mayor que las células control mostrando mayor generación de estrés oxidativo. La fluorescencia emitida por las células sin tratamiento de AO fue de 45.4 UA, significativamente mayor que en las células control. Esto nos indicó una mayor generación de ERO en éstas células. Además los hepatocitos aislados de animales con SM muestran mayor sensibilidad al AO que los hepatocitos control.

6.7. EFECTO DEL CLORURO DE DIFENILENIODONIO (DPI) SOBRE LA GENERACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR EL ÁCIDO OLEICO EN HEPATOCITOS AISLADOS.

Para investigar el efecto del DPI se usaron 100 μ M de AO, esto con base en los experimentos previos cuya concentración de AO se consideró suficiente para demostrar la generación de estrés oxidativo en hepatocitos aislados.

Para determinar a qué nivel se estaba generando estrés oxidativo inducido por el AO, se utilizó DPI que es un inhibidor del complejo NADPH oxidasa, una proteína clave en la producción de ERO en la membrana plasmática. La concentración de DPI que se utilizó fue de 1 μ M, en presencia y ausencia de AO 100 μ M (Figura 19).

Los niveles de fluorescencia del DCF índice de estrés oxidativo, en presencia de AO (100 μ M) fue significativamente más alto que en las células sin AO, tanto en el grupo SM y control. Cuando se preincubaron las células con DPI

en presencia de AO, la fluorescencia del DCF disminuyó de manera significativa ($P < 0.01$) en el grupo control únicamente (Figura 19).

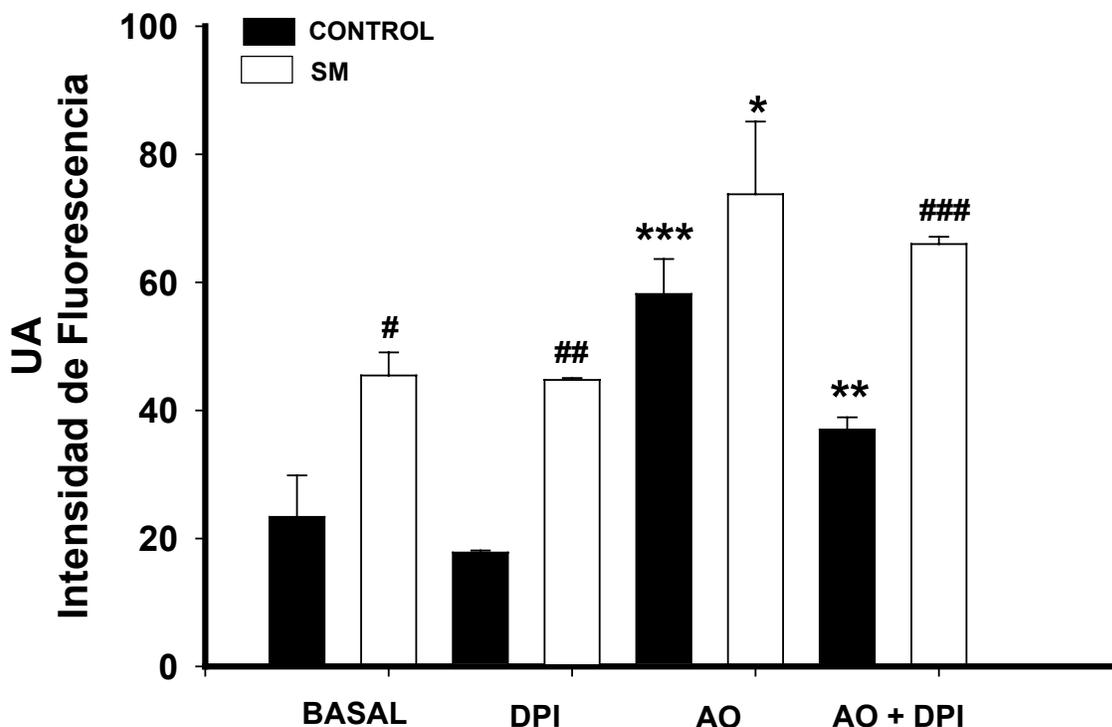


Figura 19. Efecto del DPI (1 μM) sobre la generación de ERO inducida por AO (100 μM) en hepatocitos aislados de ratas control y ratas SM. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, los valores fueron determinados con base en la fluorescencia emitida por 1000 células en cada ensayo. Los valores de cada barra representan la media \pm DE de 5 animales diferentes. * $p < 0.05$ (SM vs SM+AO); ** $p < 0.01$ (Con+AO vs Con+AO+DPI); *** $p < 0.001$ (Con+AO vs Con); # $p < 0.05$ (SM vs Con); ## $p < 0.01$ (SM+DPI vs Con+DPI), ### $p < 0.001$ (SM+DPI+AO vs Con+DPI+AO).

Según los resultados mostrados en la Figura 19, el complejo NADPH oxidasa no es la principal fuente de generación de estrés oxidativo en presencia del AO, por este motivo se realizaron pruebas con 10 μM de rotenona. La rotenona es un inhibidor específico del transporte de electrones a nivel del complejo I de la

cadena respiratoria mitocondrial, éste compuesto se utilizó para determinar si a nivel de la cadena respiratoria se genera una mayor producción de ERO y por consiguiente mayor estrés oxidativo (Figura 20).

En la figura 20 se muestra que la preincubación de hepatocitos con rotenona 10 μM durante 20 minutos, induce una disminución significativa del estrés oxidativo que genera el AO 100 μM en las células.

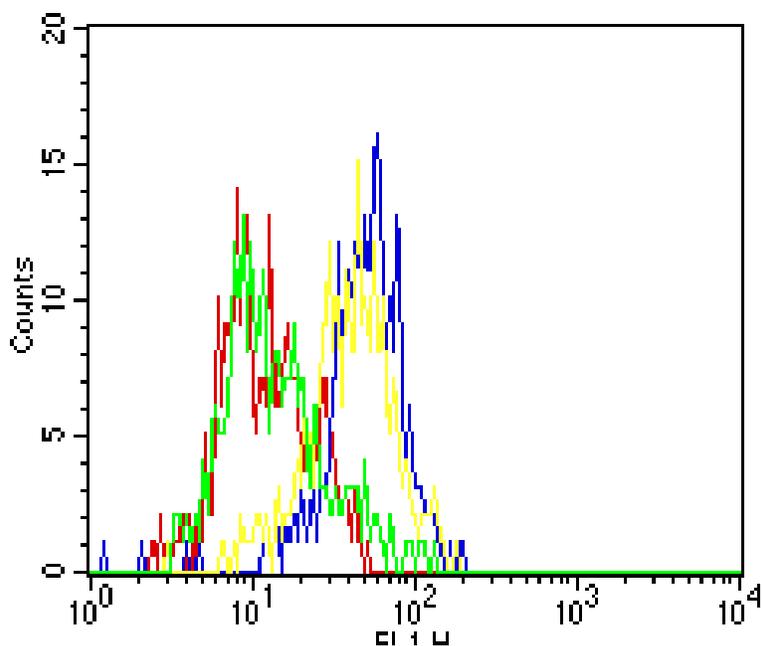


Figura 20. Efecto de rotenona 10 μM sobre el estrés oxidativo generado por el ácido oleico en hepatocitos aislados. El histograma representa un solo ensayo analizado por citometría de flujo. (rojo: basal, azul: AO 100 μM , amarillo: AO 100 μM + DPI 1 μM , verde: AO 100 μM + Rotenona 10 μM)

La incubación de los hepatocitos de animales control con el AO induce mayor generación intracelular de ERO ($p < 0.001$). Este aumento en la fluorescencia fue inhibido significativamente por la rotenona (Figura 21). La rotenona sola no tuvo efecto sobre la fluorescencia del DCF, indicando que son dos las fuentes generadoras de estrés oxidativo a nivel celular 1) a través del complejo NADPH oxidasa en membrana plasmática y 2) a través de la cadena respiratoria mitocondrial.

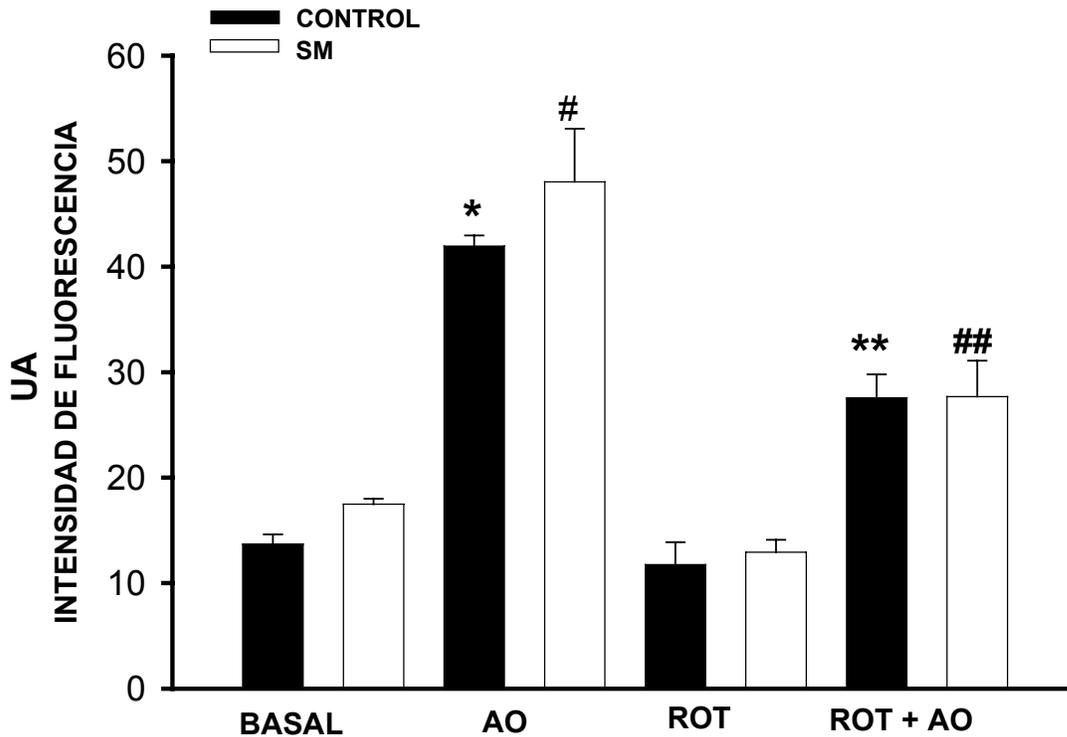


Figura 21. Efecto de la rotenona sobre la generación intracelular de ERO en hepatocitos de ratas control y SM. Las muestras se analizaron por citometría de flujo. Los valores fueron determinados con base en la fluorescencia emitida por 1000 células en ensayos por duplicado y expresados en unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia. Los valores de cada barra son expresados como la media \pm DE de 5 animales diferentes. * $p < 0.001$ (Con vs Con+AO), ** $p < 0.001$ (Con+AO vs Con+Rot+AO), # $p < 0.001$ (SM vs SM+AO), ## $p < 0.001$ (SM+AO vs SM+Rot+AO).

En hepatocitos aislados de ratas con SM el efecto de la rotenona fue similar al observado con los hepatocitos control, disminuyó significativamente (* $p < 0.001$) la generación de ERO. El estrés oxidativo basal en los hepatocitos aislados de los animales con SM es significativamente mayor ($p < 0.01$) que la de los hepatocitos

aislados de animales control, debido probablemente al estrés oxidativo ya existente en éstas células por el flujo constante de AGNE.

La rotenona inhibe la fluorescencia en igual magnitud en ambos grupos.

7. DISCUSIÓN

La resistencia a la insulina, definida como una acción disminuida de la insulina en sus órganos blanco, especialmente tejido adiposo, muscular y hepático

junto con hiperinsulinemia compensadora. La resistencia a la insulina se ha asociado con la aparición de diversas enfermedades metabólicas, que son agrupadas bajo el nombre de síndrome metabólico, descrito por Reaven y conocido inicialmente como síndrome X (1).

METABOLISMO DE AGNE Y RESISTENCIA A LA INSULINA.

El modelo animal con dieta alta en hidratos de carbono en el agua de bebida, fue desarrollado en el laboratorio para investigar el mecanismo por el cual las alteraciones en el metabolismo de lípidos contribuyen al desarrollo de la obesidad, la hipertensión y la resistencia a la insulina (109-113). Como se ha encontrado en nuestro modelo de síndrome metabólico el aumento en los triglicéridos observado en los animales con SM refleja una alta actividad lipogénica en el hígado debido al consumo de sacarosa y una actividad glucolítica alta. La hipertrigliceridemia resulta en una acumulación del exceso de energía como triglicéridos en el tejido adiposo sobre todo en la cavidad intra-abdominal. La acumulación de la grasa predominantemente en la cavidad intra-abdominal se asocia con alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa, con la hiperinsulinemia y con hipertensión (125, 126).

El mecanismo por el cual se acumula la grasa en el tejido adiposo está bien descrito en la literatura (127). Los ácidos grasos son activados mediante la formación del correspondiente acil-CoA por medio de una acil-CoA sintetasa, y a continuación son esterificados con el glicerol-3-fosfato a triacilglicerol para ser almacenados (47). El glicerol-3-fosfato se genera a partir de la reducción de la hidroxacetona la cual aumenta durante la glucólisis.

Existe evidencia que el adipocito funciona como una célula endócrina sintetizando y secretando diversas moléculas con acción local (auto o paracrina) y a distancia, que no sólo intervienen en la regulación del metabolismo y desarrollo del propio tejido adiposo, sino también desempeñando otros papeles diferentes a su reconocida participación en la homeostasis energética, como lo es la inmunidad o sistema cardiovascular entre otros.

Las concentraciones fisiológicas de los AGNE plasmáticos circulantes deben mantenerse dentro de un rango muy estrecho, y un aumento anormal de ellos se asocia a diversas enfermedades entre ellas: obesidad, diabetes tipo 2, aterosclerosis y otras. Los mecanismos por los cuales los AGNE conducen a éstas no están del todo establecidos, pero su contribución a la generación de resistencia a la insulina parece ser uno de los más importantes.

En este modelo experimental se demostró que al aumentar la ingesta de carbohidratos los animales desarrollan SM con aumento en la concentración de los AGNE en plasma y en tejido hepático. Además este aumento en la concentración de los AGNE en los animales con SM resulta de un incremento de algunos ácidos grasos como: el ácido palmítico, palmitoleico y ácido oleico. El ácido palmitoleico y el ácido oleico son productos de la desaturación del ácido palmítico y del ácido esteárico respectivamente. El aumento observado en la concentración de los ácidos grasos mono-insaturados se debe a una alta actividad de la delta9-desaturasa como se ha observado previamente en los microsomas de hígado de los animales con SM (113). La concentración alta de los AGNE en el plasma puede explicarse por una mayor actividad lipolítica a nivel del tejido

adiposo. En los procesos de la lipólisis, la lipasa hormono-sensible (LHS) es la enzima limitante en la liberación de los AGNE a partir del tejido adiposo. Esta enzima es susceptible a la fosforilación y a la desfosforilación en respuesta a los niveles del AMPc controlado hormonalmente (48). La fosforilación activa la LHS estimulando la lipólisis en el tejido adiposo, elevando la concentración de los AGNE circulantes y finalmente activando la ruta de la β -oxidación en otros tejidos u órganos, tales como el hígado y el músculo esquelético (49). En el caso de una dieta alta en carbohidratos, los altos niveles de la insulina secretada en respuesta a concentraciones elevadas de glucosa en la sangre disminuyen los niveles de AMPc. Esta situación conduce a la desfosforilación de la lipasa hormono-sensible y por tanto, su inactivación, inhibiendo la liberación de los ácidos grasos para la oxidación. En el caso de resistencia a la insulina, la LHS es insensible a la inhibición por la insulina y por consecuencia se observa un aumento en la concentración de los AGNE circulantes.

Los animales con SM desarrollaron resistencia a la insulina que se demostró mediante el experimento del clamp o pinza hiperinsulinémica-euglicémica. Se determinó la velocidad de infusión de la glucosa exógena requerida en presencia de hiperinsulinemia para mantener la glucosa plasmática normal, este experimento demostró la sensibilidad de los tejidos a la insulina para la incorporación de la glucosa a través de la membrana plasmática.

AGNE Y LA FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR DE INSULINA Y DEL IRS-1.

La resistencia a la insulina resulta de la alteración en la interacción de la insulina con su receptor para llevar a cabo una serie de señalizaciones que implican la fosforilación de varias proteínas que inducen la translocación del transportador de la glucosa (GLUT4) hacia la membrana plasmática.

Por otra parte los AGNE participan en el desarrollo de la resistencia a la insulina asociada con obesidad. En el trabajo realizado por Fukuchi et al, 2004 (128), donde se analizan cambios en la composición de AGNE en la progresión de obesidad y algunos desórdenes metabólicos relacionados, se propone que el hígado puede ser el sitio inicial del desbalance de los AGNE y que alteraciones en la concentración de AGNE hepáticos pueden llevar a un desbalance en otros tejidos.

En nuestro modelo la rata con SM se caracterizó por un aumento en la concentración de los AGNE y de los triglicéridos circulantes y del hígado que pueden participar en la amplificación de las anomalías metabólicas que son características del síndrome de resistencia a la insulina y la diabetes tipo II (51). Los mecanismos bioquímicos precisos por los que los AGNE y los triglicéridos del citosol ejercen sus efectos permanecen no esclarecidos.

En el análisis realizado de la fosforilación del receptor de insulina en hígado de ratas con SM se encontró que el nivel de fosforilación basal sin estímulo con insulina fue menor en comparación con el grupo control, es probable que durante el periodo de tratamiento con carbohidratos se desarrollara cierta alteración en la funcionalidad del receptor de insulina, Esta hipótesis se apoya quizás por la presencia incrementada de AGNE en estos animales. La administración del ácido oleico (AGNE de mayor contenido en hígado de ratas SM) a los animales, por

tiempos cortos indujo una disminución en la fosforilación del residuo de tirosina de IR- β y del IRS1. Lo anterior es una de las características de la resistencia a la insulina inducida por AGNE o sus metabolitos (ceramidas, diacilglicerol, etc.) los cuales activan PKC θ , cinasas serina/treonina, aumentando la fosforilación de serina/treonina del receptor de insulina o sus sustratos y disminuyendo la fosforilación de residuos de tirosina, provocando así un desajuste en la acción de la insulina (129).

El pre-tratamiento de los animales con el antioxidante NAC protege del efecto del ácido oleico, sobre la fosforilación de IR- β y de IRS-1 en el animal entero. Los resultados de este experimento sugieren que el ácido oleico reduce la fosforilación del receptor de insulina (IR- β) generando ERO y estrés oxidativo, lo que nos indica que los AGNE pueden desequilibrar la acción de la insulina mediante un incremento en los niveles de estrés oxidativo. Existe evidencia *in vitro* que indica que los AGNE elevados tienen efectos adversos sobre la función mitocondrial, incluyendo el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, y la generación de ERO incluyendo $\cdot\text{O}_2^-$ (129). En el caso del IRS-1 se presentaron cambios pero no significativos, en el nivel de fosforilación de sus residuos de tirosina entre los animales control y SM, pero aunque el cambio no fue significativo, la presencia de NAC protege contra el estrés oxidativo que se genera.

Las moléculas reactivas de oxígeno y nitrógeno se consideran productos tóxicos del metabolismo. Sin embargo, existe evidencia que revela que las especies reactivas pueden ser moléculas de señalización que están involucradas

en la regulación de la función celular (130). La producción crónica o aguda de estas moléculas reactivas o la capacidad reducida para su eliminación, denominado estrés oxidativo, puede llevar a cambios anormales en la señalización intracelular y resultar en resistencia a la insulina (130). Un incremento en la concentración de moléculas reactivas lleva a la activación de cascadas de cinasas serina/treonina tal como la cinasa c-Jun n-terminal, factor nuclear $\kappa\beta$ y otros blancos susceptibles de fosforilarse, incluyendo el receptor de insulina y las proteínas sustrato del receptor de insulina (131). Al incrementarse la fosforilación IRS-1 en sus residuos de serina se reduce la capacidad de fosforilación sobre los residuos de tirosina y se puede acelerar la degradación de IRS-1, ofreciendo una atractiva explicación sobre las bases moleculares de resistencia a la insulina inducida por estrés oxidativo. Estudios realizados con antioxidantes como la vitamina E o NAC indican un impacto benéfico sobre la sensibilidad a la insulina, ofreciendo la posibilidad para nuevos tratamientos en casos de resistencia a la insulina (132).

La fosforilación de IRS-1 sobre sus residuos de tirosina es requerida para la respuesta estimulada por insulina, mientras que la fosforilación de IRS-1 sobre sus residuos de serina tienen un doble papel, ya sea que aumenten o terminen los efectos de la insulina. La activación de PKB en respuesta a la insulina propaga la señalización de insulina y promueve la fosforilación de IRS-1 sobre sus residuos de serina, presentando la generación de un vínculo de retroalimentación positiva por acción de la insulina. La insulina también activa varias cinasas y estas cinasas actúan induciendo la fosforilación de IRS-1 sobre sitios específicos e inhibiendo

sus funciones (131). Esto es parte del control de retroalimentación negativo, mecanismo inducido por la insulina que lleva a la finalización de su acción. Agentes tal como los AGNE, citocinas, angiotensina II, endotelina-1, aminoácidos, estrés celular e hiperinsulinemia, lo cual conduce a resistencia a la insulina llevando tanto a la activación de varias cinasas de los residuos serina / treonina y fosforilación de IRS-1 (131). Estos agentes regulan negativamente las funciones de IRS-1 por fosforilación.

AGNE Y GENERACION DE ESTRÉS OXIDATIVO EN HEPATOCITOS.

La generación intracelular de ERO en los hepatocitos aislados de los animales control y con SM en presencia del ácido oleico puede darse a diferentes niveles. Uno de ellos es la participación del complejo NADPH oxidasa y la otra a nivel del metabolismo mitocondrial. Al utilizar DPI para bloquear, la generación de ERO se atribuyó a la participación de la actividad de NADPH oxidasa, una de las principales fuentes generadoras de ERO a nivel membrana plasmática. La NADPH-oxidasa es una enzima que se activa por fosforilación por medio de la acción de la PKC. La acumulación de dehidroxiacetona fosfato (DHAP) intermediarios glucolíticos, (133) y el glicerol 3 fosfato (G3P) promueve la producción de diacilglicerol (DAG), y la subsiguiente activación de la proteína cinasa C (PKC).

El DAG es un activador natural de la PKC y su producción está probablemente aumentada en los hepatocitos como se ha descrito en las células del endotelio, la retina y los glomérulos renales, durante las complicaciones diabéticas en modelos animales y en el humano. (134). Un aumento en los AGNE

en el homogeneizado de hígado de ratas con SM puede contribuir al aumento de los Acil-CoA sustratos de la síntesis de DAG. Además, los niveles elevados de DAG se mantienen de manera crónica en animales diabéticos (135-136).

Las alteraciones celulares y funcionales atribuidas a la activación de la PKC son muy variadas, y dependen de la función de esta enzima en los mecanismos de transducción de señales. Una de sus funciones es la activación de la NADPH-oxidasa por fosforilación, generando radicales libres y estrés oxidativo que conduce a modificaciones estructurales de las proteínas. Además, los compuestos resultantes de la lipoperoxidación, como el malondialdehído, se pueden unir a las proteínas y amplificar el daño.

La otra fuente de generación de ERO y estrés oxidativo se encuentra a nivel del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial el cual se inhibe con rotenona. Al incubar los hepatocitos con rotenona y después con ácido oleico, la generación de ERO se bloqueó totalmente, lo que sugiere la participación de la mitocondria en la generación de estrés oxidativo en el hígado del modelo con SM por la gran cantidad de sustrato oxidativo en el citosol.

La generación de las ERO se encuentra aumentada en el hígado de nuestro modelo de SM y probablemente contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina.

Las ERO contribuyen a la resistencia a la insulina, debido a que interfiere con las vías de señalización inducida por esta hormona y evitan la translocación del transportador de glucosa GLUT 4 a la membrana plasmática. El mecanismo por el que contribuyen al desarrollo de resistencia de la insulina no está del todo esclarecido pero se piensa que actúan por la modificación oxidativa de

macromoléculas y por la activación del factor de transcripción NF- κ B, (137) lo que conduce a la expresión alterada de genes.

Cabe mencionar que los estudios realizados en este trabajo muestran sólo una pequeña parte del panorama general que constituye la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico, ya que también son el resultado de la interacción de factores ambientales, nutricionales y genéticos.

8. CONCLUSIONES

1. La presencia incrementada de los ácidos grasos no esterificados (AGNE) en los animales con síndrome metabólico está probablemente asociada con la disminución del grado de fosforilación del receptor de insulina (IR- β) y el sustrato

receptor de insulina-1 (IRS-1), lo cual nos indica una disminución en la sensibilidad del receptor de insulina y su vía de señalización.

2. El mecanismo por el cual los AGNE inducen este efecto está relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) o estrés oxidativo a nivel celular, primero a nivel de membrana plasmática al activarse el complejo de la proteína NADPH oxidasa y como segundo sitio a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial en el complejo I de la misma. Sin embargo, otros factores como el flujo constante de los AGNE ya sea de forma pasiva por flip-flop o activa al ser transportados por proteínas en su paso a través de la membrana, estén desensibilizando la respuesta del receptor de insulina.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Reaven GM. (1988). Banting lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 37:1595-1607.
2. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet*. 365:1415-1428.
3. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 414:782-787.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Reaven GM. (1988). Banting lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 37:1595-1607.
2. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet*. 365:1415-1428.
3. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 414:782-787.
4. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. (2004). The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 33:351-375.
5. World Health Organization. (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. *Geneve: WHO*.
6. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. (Adult Treatment Panel III, ATP III). *JAMA*. 2001. 285:2486-2497.
7. Balkau B, Charles MA. (1999). Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med*. 16:442-443.
8. Messent JW, Elliot TG, Hill RG, Keen H, Viberti GC. (1992). Prognostic significance of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes mellitus: a twenty-three-year follow-up study. *Kidney Int*. 41:836-839.

9. Schmitz A, Vaeth M. (1988). Microalbuminuria: a mayor risk factor in non insulin-dependent diabetes. A ten-year follow up study of 503 patients. *Diabet Med.* 5:126-134.
10. Cerasola G, Cottone S, Mule G, Nardi E, Mangano MT, Andronico G. (1996). Microalbuminuria, renal dysfunction and cardiovascular complications in essential hypertension. *J Hypertens.* 14:915-920.
11. American College of Endocrinology Task Force on the Insulin Resistance Syndrome: American College of Endocrinology Position Statement on the Insulin Resistance Syndrome. (2003). *Endocr Pract.* 9:236-252.
12. Reilly MP, Rader DJ. (2003). The metabolic síndrome: more than the sum of its parts? *Circulation.* 108:1546-1551.
13. Kannel WD, Anderson K, Wilson PWF. (1993). Secular blood pressure trends in normotensive persons:the Framingham study. *Am Heart J.* 125:1154-1158.
14. Pouliot MC, Dépres JP, Lemieux S, Moorjani S, Tremblay A, Nadeau A. (1994). Wiast circumference and abdominal sagital diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol.* 73:461-468.
15. Roche HM, Phillips C, Gibney MJ. (2005). The metabolic syndrome: the crossroads of diet and genetics. *Proc Nutr Soc.* 64:371-377.
16. Hitman GA, Sudagani J. (2004). Searching for genes in diabetes and the metabolic syndrome. *Int J Clin Pract.* 143:3-8.

17. Berriel Diaz M, Eiden S, Daniel C, Steinbruck A, Schmidt I. (2006). Effects of periodic intake of a high-caloric diet on body mass and leptin resistance. *Physiol Behav.* 88:191-200.
18. Perez-Echarri N, Perez-Matute P, Martinez JA, Marti A, Moreno-Aliaga MJ. (2005). Serum and gene expression levels of leptin and adiponectin in rats susceptible or resistant to diet-induced obesity. *J Physiol Biochem.* 61:333-342.
19. Janeckova R. (2001). The role of leptin in human physiology and pathophysiology. *Physiol Res.* 50:443-459.
20. Ronnema M, Karonen SL, Risannen A, Koskenvuo M, Koivisto VA. (1995). Relation between plasma leptin levels and measures of body fat in identical twins discordant for obesity. *Am Intern Med.* 126:26-31.
21. Pershadsingh HA. (2006). Dual Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha/gamma Agonist: in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus and the Metabolic Syndrome. *Treat Endocrinol.* 5:89-99.
22. Clarke SD, Jump DB. (1996). Polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Lipids.* 37:S7-S11.
23. El Hafidi Mohammed, Israel Pérez, José Zamora, Virgilia Soto, Guillermo Carvajal-Sandoval, Guadalupe Baños. (2004). Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287:R1387-R1393.
24. Avogaro A. (2006). Insulin resistance: trigger or concomitant factor in the metabolic syndrome. *Panminerva Med.* 48:3-12.

25. Zimmerman RS. (1997). Hormonal and humeral considerations in hypertension disease. *Med Clin North Am.* 81:1213-1229.
26. Sung BH, Wilson MF, Izzo JL, Ramirez L, Dandona P. (1997). Moderately obese, insulin-resistant woman exhibit abnormal vascular reactivity to stress. *Hypertension.* 29:111-114.
27. Nosadini R, Tonolo G. (2004). The role of the renin angiotensin hormonal system in the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 14:88-93.
28. Ruano M, Silvestre V, Castro R, Garcia-Lescun MC, Rodriguez A, Marco A, Garcia-Blanch G. (2005). Morbid obesity, hypertensive disease and the renin-angiotensin-aldosterone axis. *Obes Surg.* 15:670-676.
29. El Hafidi M, Valdez R, Baños G. (2000). Possible relationships between altered fatty acid composition of serum, platelets and aorta and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clin Exp Hypertens.* 22:99-108.
30. Björntorp P. (1988). Abdominal obesity and the development of noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev.* 4:615-622.
31. Despres JP, Lemieux I, Prudhomme D. (2001). Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. *BMJ.* 322:716-720.
32. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Cokkinos DV. (2005). Pathophysiology of dyslipidaemia in the metabolic syndrome. *Postgrad Med J.* 81:358-366.
33. Barter PJ, Rye KA. (1996). High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 121:1-12.

34. Bjornheden T, Babyi A, Bondjers G, Wiklund O. (1996). Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system. *Atherosclerosis*. 123:43-56.
35. Tribble DL, Rizzo M, Chait A, Lewis DM, Blanche PJ, Krauss RM. (2001). Enhanced oxidative susceptibility and reduced antioxidant content of metabolic precursors of small, dense low-density lipoproteins. *Am J Med*. 110:103-110.
36. Luengo E, Ordoñez B, Bergua C, Laclaustra M. (2005). Obesidad, dislipidemia, y síndrome metabólico. *Rev Esp Cardiol Supl*. 5:21D-29D.
37. Ayyobi AF, Brunzell JD. (2003). Lipoprotein distribution in the metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and familial combined hyperlipidemia. *Am J Cardiol*. 92:27-33J.
38. Semenkovich CF. (2004). Fatty acid metabolism and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med*. 14:72-76.
39. Daskalopoulou SS, Mikhailidis DP, Elisaf M. (2004). Prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Angiology*. 55:589-612.
40. Burjalska IJ, Kumar S, Stewar PM. (1997). Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet*. 349:1210-1213.
41. Kahn BB, Flier JS. 2000. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 106:473-481.
42. Reaven GM. (1995). Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev*. 75:473-486.
43. Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. (2006). Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta*. 368:1-19.

44. Arner P. (2005). Insulin resistance in type 2 diabetes—role of the adipokines. *Curr Mol Med.* 5:333-339.
45. Petersen KF, Shulman GI. (2006). Etiology of insulin resistance. *Am J Med.* 119:S10-S16.
46. Kobayashi K. (2005) Adipokines: therapeutic targets for metabolic syndrome. *Curr Drug Targets.* 6:525-529.
47. Foufelle F, Girard J, Ferre P. (1996). Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: a review of the potential cellular and molecular mechanisms. *Adv Enzyme Regul.* 36:199-226.
48. Slavin BG, Ong JM, Kern PA. (1994). Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res.* 35:1535-1541.
49. Frayn KN, Coppack SW, Fielding BA, Humphreys SM. (1995). Coordinated regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue in vivo: Implications for the control of fat storage and fat mobilization. *Adv Enzyme regul.* 35:163-178.
50. Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA, Pan DA. (1996). Changes in insulin action, triglycerides and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am J Physiol.* 271:R1319-1326.
51. Daly ME, Vale C, Walker M, Alberti KG, Mathers JC. (1997). Dietary carbohydrates and insulin sensitivity: a review of the evidence and clinical implications. *Am J Clin Nutr.* 66:1072-1085.
52. Christopher F. (1994). The transmembrane translocation of lipids. *Cell.* 79:393-395.

53. Clouthier DE, Comerford SA, Hammer RE. (1997). Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice. *J Clin Invest.* 100:2697-2713.
54. Pegorier JP, Le May C, Girard J. (2004). Control of gene expression by fatty acids. *J Nutr.* 134:2444S-2449S.
55. Duplus E, Forest C. (2002). Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription?. *Biochem Pharmacol.* 64:893-901.
56. Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard BV, Ravussin E. (1995). A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia.* 38:1213–1217.
57. Ginsberg BH, Chatterjee P, Yorek M (1987) Increased membrane fluidity is associated with greater sensitivity to insulin. *Diabetes.* 36:1-15A.
58. Ginsberg BH, Jabour J, Spector AA (1982). Effect of alterations in membrane lipid unsaturation on the properties of the insulin receptor of Ehrlich ascites cells. *Biochem Biophys Acta.* 690:157-164.
59. Field CJ, Ryan EA, Thomson AB, Clandinin MT. (1988). Dietary fat and the diabetic state alter insulin binding and the fatty acyl composition of the adipocyte plasma membrane. *Biochem J.* 253:417-424.
60. Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV. (1993). The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. *N Engl J Med.* 328:238-244.

61. Hunter SJ, Garvey WT. (1998). Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors signal transduction, and glucose transport effector system. *Am J Med.* 105:331-345.
62. Seino S, Seino M, Nishi S, Bell GI. (1989). Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:114-118.
63. Wang B, Balba Y, Knutson VP. (1996). Insulin-induced in situ phosphorylation of the insulin receptor located in the plasma membrane versus endosomes. *Biochem Biophys Res Commun;* 227:27-34.
64. Carpentier JL, Paccaud JP. (1994). Molecular and cellular biology of insulin-receptor internalization. *Ann N Y Acad Sci.* 733:266-278.
65. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature.* 352:73-77.
66. Myers MG Jr, Zhang Y, Aldaz GA, Grammer T, Glasheen EM, Yenush L, Wang LM, Sun XJ, Blenis J, Pierce JH, White MF. (1996). YMXM motifs and signalling by an insulin receptor substrate 1 molecule without tyrosine phosphorylation sites. *Mol Cell Biol.* 16:4147-4155.
67. He W, Craparo A, Zhu Y, O'Neill TJ, Wang LM, Pierce JH, Gustafson TA. (1996). Interacción of insulin receptor substrate-2 (IRS-2) with the insulin and insulin-like growth factor 1 receptors. *J Biol Chem.* 271:11641-11645.
68. Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. (1997). A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine

phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 272:29911-29918.

69. Shepherd PR, Whithers DJ, Siddle K. (1998). Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signaling. *Biochem J.* 333:471-490.
70. Friedman JE, Ishizuka T, Liu S, Farrell CJ, Bedol D, Koletsky RJ, Kaung HL, Ernsberger P. (1997). Reduced insulin receptor signaling in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Am J Physiol.* 273:E1014-23.
71. Evans JL, Honer CM, Womelsdorf BE, Kaplan EL, Bell PA. (1995). The effects of wortmannin, a potent inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, on insulin-stimulated glucose transport, GLUT4 translocation, antilipolysis, and DNA synthesis. *Cell Signal.* 7:365-376.
72. Shepherd PR, Khan BB. (1999). Glucose transporters and insulin action—implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 341:248-257.
73. Doege H, Shurmann A, Bahrenberg G, Brauers A, Joost HG. (2000). GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem.* 275:16275-16280.
74. Saravanan N, Haseeb A, Ehtesham NZ, Ghafoorunissa. (2005). Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. *Eur J Endocrinol.* 153:159-165.

75. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, Colette C. (2006). Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA*. 295:1681-1687.
76. Krssak M, Petersen KF, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Roden M, Shulman GI. (1999). Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia*. 42:113-116.
77. Groop LC, Saloranta C, Shank M, Bonadonna RC, Ferrannini E, De Fronzo RA. (1991). The role of free fatty acid metabolism in the pathogenesis of insulin resistance in obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 72:96–107.
78. Golay A, Swislocki AL, Chen YD, Reaven GM (1987). Relationships between plasma-free fatty acid concentration, endogenous glucose production, and fasting hyperglycemia in normal and non-insulin-dependent diabetic individuals. *Metabolism*. 36:692– 696
79. Saloranta C, Groop L. (1996). Interactions between glucose and FFA metabolism in man. *Diabetes Metab Rev*. 12:15–36.
80. Byrne CD, Wareham NJ, Brown DC, Clark PM, Cox LJ, Day NE, Palmer CR, Wang TW, Williams DR, Hales CN. (1994). Hypertriglyceridaemia in subjects with normal and abnormal glucose tolerance: relative contributions of insulin secretion, insulin resistance and suppression of plasma non-esterified fatty acids. *Diabetologia*. 37:889–896.

81. Chen YD, Golay A, Swislocki AL, Reaven GM. (1987). Resistance to insulin suppression of plasma free fatty acid concentrations and insulin stimulation of glucose uptake in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 64:17–21.
82. Charles MA, Eschwege E, Thibault N, Claude JR, Warnet JM, Rosselin GE, Girard J, Balkau B. (1997). The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects: results of the Paris Prospective Study. *Diabetologia.* 40:1101–1106.
83. Egan BM, Hennes MM, Stepniakowski KT, Oshaughnessy IM, Kissebah AH, Goodfriend TL. (1996). Obesity hypertension is related more to insulin's fatty acid than glucose action. *Hypertension.* 27:723–728.
84. Hastrup AT, Stepniakowski KT, Goodfriend TL, Egan BM. (1998). Intralipid enhances alpha1-adrenergic receptor mediated pressor sensitivity. *Hypertension.* 32:693– 698.
85. Kamide K, Rakugi H, Nakano N, Ohishi M, Nakata Y, Takami S, Katsuya T, Higaki J, Ogihara T. (1997). Insulin resistance is related to silent cerebral infarction in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens.* 10:1245–1249.
86. Yip J, Facchini FS, Reaven GM. (1998). Resistance to insulin-mediated glucose disposal as a predictor of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:2773–2776.
87. Lee KU, Lee HK, Koh CS, Min HK. (1988). Artificial induction of intravascular lipolysis by lipid-heparin infusion leads to insulin resistance in man. *Diabetologia.* 31:285-290.

88. Roden M, Krssak M, Stingl H, Gruber S, Hofer A, Fornsinn C, Moser E, Waldhausl W. (1999). Rapid impairment of skeletal muscle glucose transport/phosphorylation by free fatty acids in humans. *Diabetes*. 48:358-364.
89. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*. 97:2859-2865.
90. Boden G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*. 46:3-10.
91. Randle PJ, Garland PB, Newsholme EA, Hales CN. (1965). The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus. *Ann NY Acad Sci*. 131:324-333.
92. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*. 1:785-789.
93. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*. 97:2859-2865.
94. Krebs M, Krssak M, Nowotny P, Weghuber D, Gruber S, Mlynarik V, Bischof M, Stingl H, Fornsinn C, Waldhaus W, Roden M. (2001). Free fatty acids inhibit the glucose stimulated increase of intramuscular glucose-6-phosphate concentration in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 86:2153-2160.

95. Roden M, Krssak M, Stingl H, Gruber S, Hofer A, Fornsinn C, Moser E, Waldhausl W. (1999). Rapid impairment of skeletal muscle glucose transport/phosphorylation by free fatty acids in humans. *Diabetes* 48:358-364.
96. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest.* 103:253-290.
97. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. (1999). Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein Kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes.* 48:1270-1274.
98. Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ, Kraegen EW. (1998). Five-hour fatty acid elevation increases muscle lipids and impairs glycogen synthesis in the rat. *Metabolism.* 47:1121-1126.
99. Shulman GI. (2000). Cellular mechanism of insulin resistance. *J Clin Invest;* 106:171-176.
100. Koshkin V, Wang X, Scherer PE, Chan CB, Wheeler MB. (2003). Mitochondrial functional state in clonal pancreatic beta-cells exposed to free fatty acids. *J Biol Chem.* 278:19709-19715.
101. Yang S, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush MA, Diehl AM. (2000). Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys.* 378: 259-268.

102. Cocco T, Di Paola M, Papa S, Lorusso M. (1999). Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med.* 27: 51-59.
103. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. 3^a edición. Oxford University Press, Oxford.
104. Hansberg W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje Bioquímico, Fac. Medicina, UNAM. Vol XXVI: 19-55.
105. Vostruba M., Vesily K. (1997). The antioxidants in medical programme for prevention and treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 134:202-209.
106. Amábile C. y Fuentes A. (1999). Antioxidantes: fundamentos de su uso en la medicina del 2000. 1^a edición. Corporativo intermédica, S.A. de C. V. pp 1-66.
107. Kelly GS. (1998). Clinical Applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev.* 3:114-127.
108. Reaven GM, Ho H. (1991). Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens.* 4:610-614.
109. Baños G, Carvajal K, Cardoso G, Zamora J, Franco M. (1997). Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertension and hypertriglyceridemia. *Am J Hypertens.* 10:379-388.
110. Nava P, Guarner V, Posadas R, Perez I, Banos G.(1999). Insulin-induced endothelin release and vasoreactivity in hypertriglyceridemic and hypertensive rats. *Am J Physiol.* 277:H399-H404.

111. Pérez I, El Hafidi M, Sanchez C, Baños G (1999). Effect of sugar-induced hypertension in rats on the pattern of serum arachidonic, dihomog-linolenic and linoleic acids. *Med Sci Res.* 27:847-849.
112. El Hafidi M, Baños G. (1997). In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension.* 30:624-628.
113. El Hafidi M, Cuéllar A, Ramírez J, Baños G. (2001). Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal Delta9 and Delta5-desaturase activities. *J Nutr Biochem.* 12:396-403.
114. Tran TT, Gupta N, Goh T, Naigamwalla D, Chia MC, Koohestani N, Mehrotra S, McKeown-Eyssen G, Giacca A, Bruce WR. (2003). Direct measure of insulin sensitivity with the hyperinsulinemic-euglycemic clamp and surrogate measures of insulin sensitivity with the oral glucose tolerance test: correlations with aberrant crypt foci promotion in rats. *Cáncer Epidemiol, Biomarkers Prev.* 12:47-56.
115. Nagele U, Hägele EO, Sauer G, Wiedemann E, Lehmann P, Wahlefeld AW, Gruber W. (1984). Reagent for the enzymatic determination of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency. *J Clin Chem Clin Biochem.* 22:165-174.
116. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 226:497-509.

117. Tserng KY, Kliegman RM, Miettinen EL, Kalhan SC. (1981). A rapid, simple, and sensitive procedure for the determination of free fatty acids in plasma using glass capillary column gas-liquid chromatography. *J Lipid Res.* 22:852-858.
118. Bezerra RM, Ueno M, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CR, Saad MJ. (2000). A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J Nutr.* 130:1531-1535.
119. López-Marure R, Ventura JL, Sanchez L, Montano LF, Zentella A. (2000). Ceramide mimics tumor necrosis factor-alpha in the induction of cell cycle arrest in endothelial cells. Induction of the tumour suppressor p53 with decrease in retinoblastom/proteins levels. *Eur J. Biochem.* 267:4325-4333.
120. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.
121. Berry MN., Friend DS. (1979). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol.* 43:506-520.
122. Qu B, Li QT, Wong KP, Tan TM, Halliwell B. (2001). Mechanism of clofibrate hepatotoxicity: mitochondrial damage and oxidative stress in hepatocytes. *Free Radic. Biol Med.* 31:659-669.
123. Lacort M, Leal AM, Liza M, Martin C, Martinez R, Ruiz-Larrea MB. (1995). Protective effect of estrogens and catecholestrogens against peroxidative membrane damage in vitro. *Lipids.* 30:141-146.

124. O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT, England PJ. (1993). Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J.* 290: 41-49.
125. Kanai H, Tokunaga K, Fujioka S, Yamashita S, Kameda-Takemura KK, Matsuzawa Y. (1996). Decrease in intra-abdominal visceral fat may reduce blood pressure in obese hypertensive women. *Hypertension.* 27:125-129.
126. Despres JP. (1991). Obesity and lipid metabolism: Relevance of body fat distribution. *Curr Opin Lipid.* 2:5-15.
127. Kopelman PG. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature.* 404:635-643.
128. Fukuchi S, Hamaguchi K, Seike M, Himeno K, Sakata T, Yoshimatsu H. (2004). Role of fatty acid composition in the development of metabolic disorders in sucrose-induced obese rats. *Exp Biol Med.* 229:486-493.
129. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 23:599-622.
130. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans.* 29:345-350.
131. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie.* 87:99-109.

132. Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. (2005). The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*. 7:1040-1052.
133. Wolf BA, Williamson JR, Easom RA, Chang K, Sherman WR, Turk J. (1991). Diacylglycerol accumulation and microvascular abnormalities induced by elevated glucose levels. *J Clin Invest*. 87:31-38.
134. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Kohner EM, et al. (2003). Protein kinase C beta 2-dependent phosphorylation of core 2 GlcNAc-T promotes leukocyte-endothelial cell adhesion: a mechanism underlying capillary occlusion in diabetic retinopathy. *Diabetes*. 52:1519-1527.
135. Gaster M, Rustan AC, Beck-Nielsen H. (2005). Differential utilization of saturated palmitate and unsaturated oleate: evidence from cultured myotubes. *Diabetes*. 54:648-56.
136. Kraegen EW, Saha AK, Preston E, Wilks D, Hoy AJ, Cooney GJ, Ruderman NB. (2006). Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 290:E471-479.
137. Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofer S, Ziegler R, Nawroth PP. (1999). The role of oxidative stress and NF-kappa β activation in late diabetic complications. *Biofactors*. 10:157-167.