Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Cambios morfológicos y funcionales en la corteza adrenal en un modelo animal de resistencia a la insulina inducida por la administración de una dieta rica en sacarosa

Martinez Calejman, Camila

2013-03-11

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Martinez Calejman, Camila. (2013-03-11). Cambios morfológicos y funcionales en la corteza adrenal en un modelo animal de resistencia a la insulina inducida por la administración de una dieta rica en sacarosa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Martinez Calejman, Camila. "Cambios morfológicos y funcionales en la corteza adrenal en un modelo animal de resistencia a la insulina inducida por la administración de una dieta rica en sacarosa". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-03-11.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Cambios morfológicos y funcionales en la corteza adrenal en un modelo animal de resistencia a la insulina inducida por la administración de una dieta rica en sacarosa

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas.

Autor: Lic. Camila Martinez Calejman

Directores de Tesis: Prof. Dra. Cora B. Cymeryng

Prof. Dr. Pablo Arias

Consejero de Estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Endocrinología Molecular

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina,

Universidad de Buenos Aires / CEFyBO-CONICET

2012

Cambios morfológicos y funcionales en la corteza adrenal de un modelo animal de resistencia a la insulina inducida por la administración de una dieta rica en sacarosa.

La activación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal ha sido ampliamente descripta tanto en pacientes como en modelos animales de insulinorresistencia (IR). Sin embargo, el efecto del desarrollo de este estado de IR sobre la función adrenal no ha sido dilucidado por completo. En este sentido, el objetivo del presente trabajo de tesis fue estudiar los cambios morfológicos y funcionales que ocurren en la glándula adrenal en animales con insulinorresistencia inducida por una dieta rica en sacarosa (DRS). Los animales del grupo DRS mostraron un mayor peso corporal y de sus depósitos lipídicos junto con una alteración en el perfil metabólico característica de la IR en la séptima semana de tratamiento. En cuanto a la función adrenal, estos animales presentaron mayores niveles basales de corticosterona circulantes y una respuesta disminuida al ACTH exógeno. En forma paralela observamos un aumento en los niveles de expresión de proteínas claves de la esteroidogénesis (StAR y CYP11A1) y una disminución en la expresión del receptor de ACTH (MC2R). Las glándulas adrenales del grupo DRS fueron más pequeñas y livianas que las de los correspondientes controles y mostraron un aumento en la infiltración lipídica con predominio de triglicéridos. Demostramos también que los animales alimentados con DRS desarrollan en forma local un estado inflamatorio evidenciado por el aumento en la expresión de citoquinas y marcadores proinflamatorios, en la actividad de NOS y en la expresión de COX-2. También observamos un incremento del sistema de HO-1, posiblemente como respuesta a la generación de estrés oxidativo en la corteza adrenal. La desregulación en la actividad de estos sistemas posiblemente también afecte la esteroidogénesis adrenal.

Finalmente estudiamos el efecto de dos tratamientos insulinosensibilizadores. Tanto el tratamiento farmacológico como la

implementación del protocolo de ejercicio lograron prevenir las alteraciones funcionales y morfológicas observadas en la corteza adrenal de los animales alimentados con DRS.

Palabras claves: adrenal, esteroidogénesis, insulinorresistencia, dieta rica en sacarosa.

Morphological and functional changes detected in rat adrenal cortex of an animal model of insulin resistance induced by means of a sucrose-rich diet (SRD).

Studies performed both in humans and in animal models of insulin resistance (IR) show hyperactivation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. However, a possible direct effect of the IR state on the adrenal function has not been fully investigated. The aim of the present studies was to analyze morphological and functional changes arising in the adrenal cortex of adult Wistar male rats rendered insulin resistant by means of a sucrose rich diet (SRD).

The SRD group showed an increase in body weight and lipid depots, as well as a characteristically altered metabolic profile at the seventh week of dietary treatment. At this time point, SRD animals showed elevated basal serum corticosterone concentrations, and a diminished response to ACTH injection. In parallel, higher expression levels of key proteins involved in steroidogenesis (StAR and CYP11A1), and a lower expression of the ACTH receptor (MC2R) were detected. Adrenal glands from the SRD group were smaller and lighter than those from the matching control group and showed an increased lipid infiltration.

Animals fed a SRD also developed a local inflammatory state evidenced in the adrenal cortex by an increased cytokine and proinflammatory markers expression as well as an increase in NOS activity and in the expression of COX-2. We also detected an induction of the HO-1 system, possibly as a response to the oxidative stress generated within the adrenal cortex. Dysregulation of these systems may also affect adrenal steroidogenesis.

Finally we studied the effect of two proven insulin-sensitizing treatments. Both therapies were able to prevent the morphological and functional changes observed in the adrenal cortex of the animals that received the SRD.

Key words: adrenal, steroidogenesis, insulin resistance, sucrose- rich diet.

Agradecimientos:

Quiero agradecer a Cora por ayudarme a crecer y desarrollarme no solo como profesional sino como persona. Por sus consejos, su apoyo incondicional, su paciencia y por sobre todas las cosas no dejar de creer en mi en todo momento.

A Pablo, por darme siempre consejos acertados, por ayudarme a ver las cosas con una mayor perspectiva y por guiarme en el desarrollo de la tesis.

A Martín, Paco, Memi, Juan Martín y Ro: ustedes me acompañaron en el día a día, en los *madrugones* y las *trasnochadas* de experimentos, en los congresos, en los éxitos y en los fracasos y hasta en la lectura y corrección de esta tesis. No podría haber hecho este trabajo sin ustedes, no tengo palabras para agradecerles.

Al todo el NROE, a Ruth, Mónica, Inés, Daniel y especialmente a Nuria, Nico, Diego, Eze y Damián por siempre estar dispuestos a darme una mano y compartir desde reactivos, protocolos hasta un mate.

A Matías y toda la gente de su laboratorio, por hacerme sentir siempre bienvenida y parte de su grupo, por la confianza y la ayuda que me brindaron en todo momento.

Al CEFyBO, en particular a la Dra. Ana Franchi por brindarme el apoyo y el espacio para realizar mi tesis.

A Cris y a Gustavo, por la infinita paciencia, confianza y todo el apoyo que me dieron en este tiempo.

A Charly, Agos, Ali, Chechu, Yas y Toti, por ser mis amigos incondicionalmente, por estar en las buenas y en las malas y ser una parte fundamental de mi vida.

A Marian, por ayudarme a transitar esta última etapa y estar dispuesta a darme un consejo, una palabra de aliento o simplemente escucharme.

A Elian, Dai, Mati, Nico, Clari y Juan, por encarar el trabajo en equipo con ganas y entusiasmo y estar siempre dispuestos a dar una mano.

Al CONICET por otorgarme las becas de posgrado que me permitieron realizar este trabajo y la Universidad de Buenos Aires por brindarme el espacio para realizarlo.

Finalmente a mi familia, por brindarme el apoyo y el cariño para iniciarme en el camino de la ciencia.

A mi abuela Nilda y sus tecitos con limón y mucha azúcar…

Los resultados presentados en este trabajo forman parte de las siguientes publicaciones y/ o presentaciones a congresos:

Publicaciones:

1. "*Insulin sensitization with a peroxisome proliferator-activated receptor-γ agonist prevents adrenocortical lipid infiltration and secretory changes induced by a high sucrose diet.*" **Martinez Calejman C**, Di Gruccio JM, Sanchez R, Repetto EM, Astort F, Mercau ME, Pandolfi M, Berg G, Schreier L, Arias P, Cymeryng C.

Journal of Endocrinology 2012 Sep; 214(3):267-76. Epub 2012 Jun 13.

Presentaciones a congresos nacionales e internacionales, con referato:

2. Poster: *"Moderate exercise prevents morphological and functional adrenocortical alterations in rats with sucrose-induced insulin resistance"* **Martinez Calejman C**; Di Gruccio JM; Jaume D; Sanchez R; Mercau M; Astort F; Arias P; Cymeryng CB. **European Association for the Study of Diabetes (EASD). Berlin, Alemania (2012).**

3. Presentación oral (a cargo): *"El ejercicio moderado previene alteraciones corticoadrenales en ratas con insulinorresistencia (IR) inducida por una dieta rica en sacarosa (DRS)"* **Martinez Calejman C**; Di Gruccio JM; Repetto EM, Astort F; Sanchez R; Mercau M; Arias P; Cymeryng CB. **Reunión anual SAIC – SAFIS – AACYTAL. Mar del Plata, Argentina (2011).**

4. Presentación oral (a cargo):*"Alteraciones funcionales y morfológicas en la corteza adrenal de ratas con insulinorresistencia (IR) inducida por una dieta rica en sacarosa (DRS)".* **Martinez Calejman C**, Di Gruccio JM, Jaume DF, Astort F, Sanchez R, Mercau M, Cymeryng CB, Arias P. **Reunión anual SAIC – SAFIS – AACYTAL, Mar del Plata, Argentina (2011).**

5. Poster: "*Sucrose-induced insulin resistance is accompanied by morphologic and functional changes in the adrenal cortex of the rat"* **Martinez Calejman C**; Repetto EM, Astort F; Sanchez R; Di Gruccio JM; Arias P and Cymeryng C. **European Association for the Study of Diabetes (EASD). Estocolmo, Suecia (2010)**

6. Poster: *"Morphological and functional changes detected in rat adrenal cortex during the induction of insulin resistance by means of a sucrose-rich diet".* **C Martinez Calejman**, EM Repetto, F Astort, JM Di Gruccio, R Sanchez, M Mercau, P Arias, CB Cymeryng.**The Endocrine Society's 92nd annual meeting (ENDO). San Diego, EEUU (2010).**

7. Presentación oral: "*Alteraciones funcionales y morfológicas corticoadrenales en ratas con insulinorresistencia (IR) inducida por una dieta rica en sacarosa (DRS). efectos del tratamiento con rosiglitazona (RSG)"* JM Di Gruccio, **C Martinez Calejman,** E Repetto, F Astort, R Sanchez, ME Mercau, CB Cymeryng, P Arias**. XVII Congreso de la Sociedad Argentina de Diabetes (SAD). Mar del Plata, Argentina (2010).**

8. Presentación oral (a cargo): **"***Induction of Insulin Resistance (IR) by a sucrose-rich diet in rats is accompanied by increased corticosterone*

secretion and lipid infiltration of the adrenal cortex". **Martinez Calejman C**; Repetto EM, Astort F; Sanchez R; Mercau M; Di Gruccio JM; Cymeryng C and Arias P. **20TH World Diabetes Congress International Diabetes Federation (IDF). Montreal, Canada (2009).**

9. Presentación oral (a cargo): *"Alteraciones en la función adrenal en un modelo de insulinorresistencia generado en ratas por una dieta rica en sacarosa".***Martinez Calejman, Camila**; Di Gruccio, Juan Martin; Repetto, Martin Esteban; Astort, Francisco; Sanchez, Rocio; Schreier, Laura; Berg, Gabriela; Cymeryng, Cora Beatriz; Arias, Pablo. **LIV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, Argentina (2009).**

Acrónimos y abreviaturas utilizadas en la presente tesis:

ACTH: hormona adenocorticotrofina

AGL: ácidos grasos libres

AKT: proteína quinasa B

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

aPKC: proteína quinasa C atípica

CD36: transportador de ácidos grasos de cadena larga

COX: ciclooxigenasa

CO: monóxido de carbono

CRH: hormona liberadora de corticotrofina

CYP11A1: citocromo P450 de clivaje de cadena lateral

DRS: dieta rica en sacarosa

E: ejercicio

GC: glucocorticoide

GL: gotas lipídicas

GLUT-4: transportador de glucosa insulino-dependiente tipo 4

HO: hemooxigenasa

HDL: lipoproteína de alta densidad

IR: insulinorresistencia

IRS: sustrato del receptor de la insulina

LDL: lipoproteína de baja densidad

MAPK: quinasa de proteínas activadas por mitógenos

MC2R: receptor de ACTH de melanocortina tipo 2

NE: norepinefrina

NFκB: factor nuclear kappa B

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

NPV: núcleo paraventricular del hipotálamo

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

POMC: pro-opiomelanocortina

PPAR: receptor activado por proliferadores de peroxisomas

RSG: rosiglitazona

StAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

TZDs: tiazolidinedionas

TG: triglicéridos

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

VP: vasopresina

Índice

pág.

Introducción 1

Insulina e insulinorresistencia..... 2

IR y acumulación ectópica de lípidos..... 7

Modelos animales de insulinorresistencia..... 11

Glucocorticoides..... 12

Síntesis de glucocorticoides..... 13

Regulación de la secreción de glucocorticoides..... 15

Sistema de la óxido nítrico sintasa (NOS)..... 17

Sistema de las ciclooxigenasas (COX)..... 19

Sistema de las hemooxigenasas (HO)..... 20

Resistencia a la insulina y el eje hipotálamo hipófiso adrenal..... 21

Enfoques terapéuticos para el tratamiento de la insulinorresistencia. 23

a. Enfoque Farmacológico..... 23

Mecanismo de acción de los PPARs 24

Mecanismo de acción de las tiazolidinedionas (TZDs)..... 25

Efecto de las TZDs sobre la IR..... 26

Efecto de las TZDs sobre la dislipemia asociada a la y la IR..... 26

Efecto de las TZDs sobre el estrés oxidativo y la inflamación asociada a la IR..... 27

b. Enfoque fisiológico: el rol del ejercicio en la insulino-sensibilidad…….. 28

Efecto de actividad física sobre la IR…..…….…….. 28

Efecto del ejercicio sobre la dislipidemia asociada a la IR…… 30

Efecto del ejercicio sobre el estrés oxidativo y la inflamación asociada a la IR..... 30

Hipótesis y Objetivos 31

Materiales y Métodos 34

Materiales…… 35

Animales y diseño experimental……..…….. 35

Test de tolerancia a la insulina intraperitoneal…….. 36

Análisis histológico y de contenido lipídico de la glándula adrenal... 36

Test de estimulación con ACTH…….. 38

Aislamiento de ARN y RT-PCR…….. 38

Inmunotransferencia..…….. 40

Determinación de la actividad enzimática de la Óxido Nítrico Sintasa…… 41

Mediciones hormonales…….. 42

Análisis estadístico……... 42

Resultados 43

Efecto de la dieta rica en sacarosa sobre la morfología y funcionalidad adrenal..... 44

Efectos de la rosiglitazona..... 61

Efectos del ejercicio moderado..... 74

Discusión 88

I. **Efecto de la dieta rica en sacarosa sobre la morfología y funcionalidad adrenal**..... 89

II. **Efecto de la rosiglitazona**..... 96

III. **Efecto del ejercicio moderado**..... 100

Conclusiones generales 104

Referencias bibliográficas 108

Introducción

Insulina e insulinorresistencia (IR)

El término homeostasis es utilizado en fisiología para referirse a los procesos destinados a asegurar la constancia de variables biológicamente relevantes del medio interno. Esencialmente, todos los órganos y tejidos del cuerpo realizan funciones que contribuyen a mantenerla. Por ejemplo, los pulmones proporcionan oxígeno al líquido extracelular para reponer el utilizado por las células, los riñones mantienen constantes las concentraciones de iones, etc. En particular, se utiliza el término de homeostasis energética para referirse a la constancia de la disponibilidad de combustibles para la utilización por los distintos sistemas del organismo. En ese sentido, la insulina es un actor principal en los mecanismos regulatorios que permiten lograr la homeostasis energética.

La insulina es una hormona anabólica sintetizada y liberada por las células β del páncreas ante un estímulo hiperglucémico. Sus acciones involucran la promoción del ingreso de carbohidratos a los tejidos insulino-dependientes y la estimulación de la síntesis de lípidos, proteínas y glucógeno.

Los efectos de la insulina se desencadenan por su interacción con un receptor ubicado en la membrana plasmática y comprenden alteraciones rápidas en el metabolismo así como la modificación de la expresión de numerosos genes blanco. El receptor de insulina es un tetrámero que contiene dos cadenas α idénticas que se exponen al espacio extracelular y dos cadenas β que atraviesan la membrana plasmática y presentan sus extremos carboxilo en el citosol. Las cadenas α contienen el dominio de unión de la insulina y los dominios intracelulares de las cadenas β presentan actividad enzimática de proteína quinasa. La unión de la insulina a su receptor estimula su propia actividad de tirosina quinasa y cada cadena β cataliza la fosforilación de residuos de tirosina de la otra cadena. La autofosforilación del receptor modifica el sitio activo de la quinasa que

entonces fosforila residuos tirosina de otras proteínas blanco. Una de esas proteínas pertenece a la familia de sustratos del receptor de la insulina (IRS) que al ser fosforilado se transforma en el punto de nucleación de un complejo de proteínas que transportan el mensaje desde el receptor al citosol y al núcleo a través de diversas proteínas intermediarias.

La proteína Grb2 (proteína de unión al receptor de la hormona de crecimiento 2) se une, mediante su dominio SH2 (dominio de homología a la quinasa Src2) a los residuos fosfotirosina de la proteína IRS y promueve la activación de la pequeña proteína G Ras. Por este mecanismo, Ras-GTP activa la cascada de señalización de la proteína quinasa ERK y se desencadenan algunos de los efectos de la insulina a nivel nuclear (fosforilación y activación del factor de transcripción Elk-1, por ejemplo) relacionados fundamentalmente con el crecimiento celular y con la inhibición de la apoptosis.

Por otra parte, la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI-3K) unida al IRS fosforilado cataliza la conversión del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) de la membrana plasmática a fosfatidilinositol trifosfato (PIP3), sitio de unión de la proteína quinasa B (PKB o Akt) en la membrana. Una vez anclada a la membrana, Akt es fosforilada por la quinasa PDK1/2 (quinasa dependiente de PIP3). En su forma activa (fosforilada), la Akt cataliza la fosforilación e inactivación de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), evitando así la fosforilación (e inactivación) de la enzima clave de la síntesis de glucógeno. Esto explicaría en parte los efectos de la insulina en el metabolismo del glucógeno en el hígado y músculo. En el músculo y en tejido adiposo la Akt también activa la translocación de los transportadores de glucosa GLUT-4 de vesículas internas a la membrana plasmática, estimulando así la entrada de glucosa desde el líquido extracelular (figura 1).

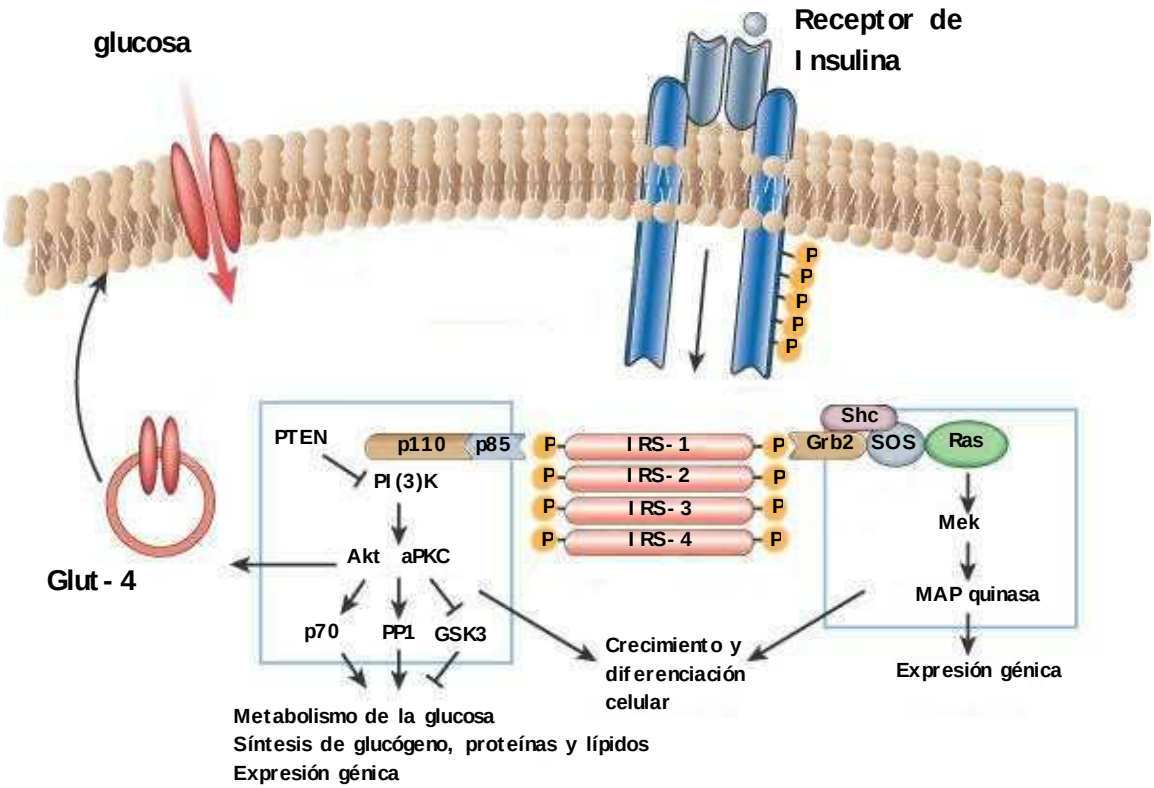


Figura 1: ***Principales vías de señalización activadas por la unión de insulina a su receptor*** *(Adaptado de [1]). IRS:1,2,3 y 4: sustrato del receptor de insulina 1,2,3 y 4; PTEN: homologo de fosfatasa y tensina; p85 y p110: subunidades de PI3 quinasa; Akt: proteína quinasa B, Grb2: proteína de unión al receptor de crecimiento; Shc: proteína adaptadora de Shc; SOS: proteína "son of sevenless"; Ras: pequeñas proteínas G, GTPasas; MEK: miembros de la familia de las MAP quinasa; GSK3: glucógeno sintasa quinasa 3; P70: serina/treonina quinasa; PP1: proteína fosfatasa 1.*

Se define insulinorresistencia (IR) como una disminución en la respuesta biológica de la hormona insulina. La IR afecta las acciones de la insulina en diferente medida debido a la variabilidad en sus efectos en las múltiples vías de transducción involucradas. Entre otros efectos, la IR resulta en un aumento de la lipólisis adipocitaria, en un incremento de la producción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y en una menor captación de glucosa por los tejidos insulinodependientes (músculo y tejido adiposo, visceral principalmente). De estas alteraciones

surgen tres modificaciones plasmáticas características que acompañan al estado de IR, y que contribuyen a su detección: aumento de los ácidos grasos libres circulantes, hipertrigliceridemia y tendencia a la hiperglucemia. La IR es un trastorno común a diversas enfermedades metabólicas, con elevada prevalencia y marcada repercusión sobre la morbimortalidad de la población general, incluyendo la obesidad, la tolerancia alterada a la glucosa, la diabetes tipo 2, la dislipidemia, la hipertensión y la enfermedad cardiovascular [2] y, por lo tanto, representa un objetivo de alto interés en la investigación médica.

Aproximadamente, un 25-30% de la población adulta occidental presenta las características del síndrome metabólico descripto por Reaven, también llamado metabólico-vascular o síndrome de insulinorresistencia (IR) [3]. Los cambios en el estilo de vida, marcados por un mayor sedentarismo (que se traduce en una disminución en el gasto calórico) y una dieta hipercalórica rica en grasas saturadas y azúcares simples, se asocia en un aumento en la índices de obesidad poblacional [4], incremento que ha alcanzado proporciones alarmantes en las últimas décadas.

Aunque la influencia genética es un factor importante en la génesis de la IR, la dieta también juega un rol preponderante [5]. Otros factores que se asocian con la IR son la dislipidemia, la hipertensión, la tolerancia alterada a la glucosa y la disfunción endotelial [6, 7].

Entre otros trastornos, la obesidad (sobre todo visceral) y la IR aumentan significativamente el riesgo de padecer *diabetes mellitus* tipo 2, hígado graso no alcohólico y/o enfermedad cardiovascular [2].

Hasta el momento no existe consenso con respecto a la etiopatogenia de la IR, ni se han determinado en forma precisa las causas y los mecanismos que a nivel celular y molecular explican el desarrollo de dicho proceso. Se han propuesto diversos procesos que participarían en el desarrollo de la IR y de la diabetes tipo 2, como son el incremento en los niveles circulantes de glucosa y de ácidos grasos que, en concentraciones

elevadas pueden tener efectos deletéreos tanto a nivel tisular como celular (glucotoxicidad y lipotoxicidad respectivamente) [8]. Si bien existe una clara asociación entre la acumulación de lípidos y la IR, se han publicado resultados discordantes con respecto a si el desarrollo de la IR se debe al aumento de lípidos circulantes o es producto de su acumulación en tejidos insulinosensibles [9, 10].

Se ha demostrado una disminución en la vía de señalización de insulina mediada por PI3K en tejidos insulinosensibles y, como consecuencia de esto, una alteración el metabolismo intracelular de la glucosa. Dado que la vía mediada por las MAPKs conserva su funcionalidad, ésta, por sus efectos proliferativos sobre las células de la pared arterial, sería responsable al menos en parte del aumento en la tasa de enfermedades cardiovasculares en pacientes con IR y con diabetes tipo 2 ([7], figura 2).

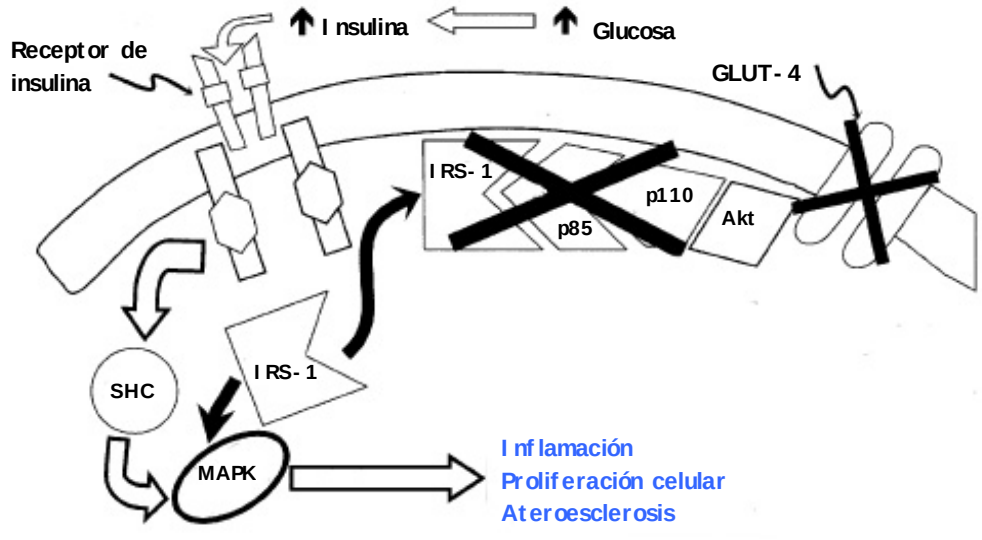


***Figura 2*: Defectos en el sistema de traducción de señales de insulina y su rol en el desarrollo de la aterosclerosis** *(adaptado de [7]). GLUT-4: transportador de glucosa de tipo 4; MAPK: mediadores de la vía de las MAP quinasas; IRS-1: sustrato del receptor de insulina 1; SHC: proteína adaptadora SHC*

Más recientemente, diversos estudios han demostrado que un factor importante en el desarrollo de la IR y la enfermedad cardiovascular es el

estado de inflamación crónica subclínica que acompaña al aumento de la grasa corporal, y en particular, del tejido adiposo visceral [11, 12]. Entre los marcadores de dicha respuesta inflamatoria se incluyen proteínas de fase aguda, citoquinas y mediadores asociados con la activación endotelial que inhibirían la señalización de la insulina y por ende podrían producir IR. Al mismo tiempo, el estado inflamatorio induce la disfunción de las células β del páncreas, que en un contexto de IR, desencadenaría la aparición de *diabetes mellitus* tipo 2 [13].

El estrés oxidativo, producto de la acumulación intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS), ocasionado por el aporte exagerado de combustibles (hiperglucemia, aumento de ácidos grasos libres circulantes), también ha sido implicado en la generación de IR [14, 15], a través de un incremento de la señalización de quinasas como JNK que fosforilan al receptor de insulina en residuos serina-treonina, disminuyendo así su capacidad de respuesta al ligando natural.

IR y acumulación ectópica de lípidos

Los lípidos (principalmente triglicéridos (TG) y ésteres de colesterol) se almacenan en gotas lipídicas (GL) en el citosol de las células del tejido adiposo, constituyendo el mayor reservorio de TG del organismo. Las personas obesas presentan un aumento tanto en el tamaño de las GL así como en la tasa de lipólisis, lo que produce un aumento de ácidos grasos libres (AGL) en sangre. Estos AGL pueden ser captados por otros tejidos (por ejemplo músculo e hígado) y transformados en TG, almacenándose en GL en estas células. En este sentido, la acumulación ectópica de TG en forma de GL en el músculo correlaciona positivamente con la magnitud de la IR a nivel muscular [16]. El incremento de TG tisulares y circulantes es un factor determinante para la aparición de IR, dislipemia, inflamación y esteatosis hepática [8, 17, 18].

La obesidad conlleva una sobrecarga de TG y un aumento en la generación de metabolitos lipídicos, como el diacilglicerol y las ceramidas, en músculo, hígado, tejido adiposo, células ß pancreáticas y tejido arterial. La lipotoxicidad asociada a estas sustancias contribuye al desarrollo de la IR, a la disfunción de las células ß y a la aterosclerosis. Las células se protegen de esta lipotoxicidad oxidando los ácidos grasos o transformándolos en TG que se almacenan en las GL.

El metabolismo de las GL está asociado con la activación de una familia de factores de transcripción, que serán descriptos más adelante, denominados "receptores activados por proliferadores de peroxisomas" (PPARs). La activación de PPARα produce un incremento en la expresión de genes que codifican para enzimas oxidativas y genera un aumento tanto en el número de GL como en la expresión de las proteínas asociadas a las mismas (como las perilipinas) [19, 20]. Otros factores de la familia de PPAR como los PPARγ y PPARδ también promueven la formación de GL [21]. Cuando los niveles de ácidos grasos superan la capacidad celular de oxidarlos, éstos se almacenan ectópicamente en forma de TG y pueden inducir apoptosis [22].

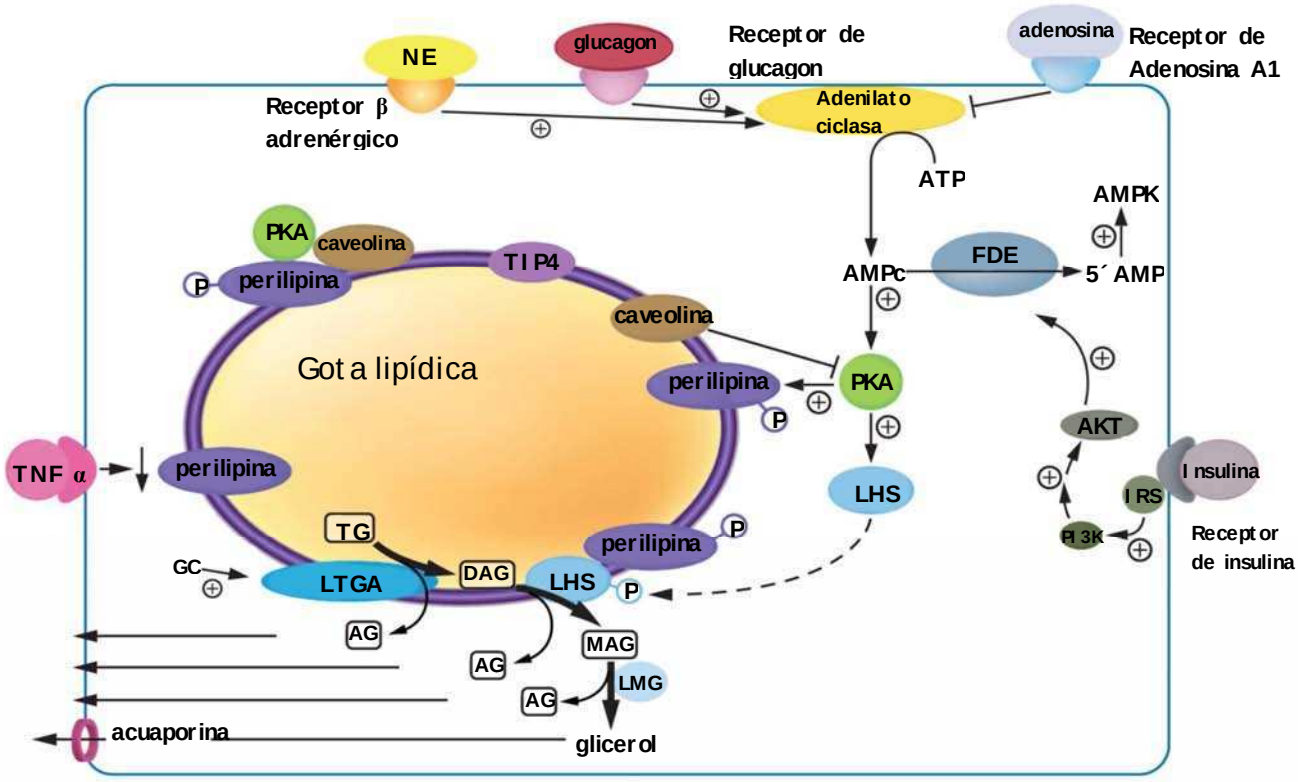


Figura 3: ***Hidrólisis de los triglicéridos provenientes de las gotas lipídicas*** *(Adaptado de [23]). LTGA: lipasa de triglicérido del tejido adiposo; LHS: lipasa hormonosensible; TIP-4: "tail-interactin protein 4"; LMG: lipasa de monoacilglicerol; AG: ácidos grasos; FDE: fosfodiesterasa; AMPc: adenosina monofosfato ciclico; TNFα: factor de necrosis tumoral alfa; PKA: proteína quinasa A; NE: norepinefrina; AMPK: adenenosina monofosfato quinasa; GC: glucocorticoides; PI3K:PI3 quinasa; Akt: proteína quinasa B.*

La hidrólisis de los TG acumulados requiere la acción secuencial de la lipasa de TG del tejido adiposo (LTGA), que cataliza la hidrólisis de TG a diacilglicerol (DAG), la lipasa hormonosensible (LHS) que hidroliza el DAG a monoacilglicerol (MAG) y la lipasa de MAG (LMG) que completa su hidrólisis (figura 3).

Como ya se mencionó, la IR característica de la obesidad ha sido asociada con un aumento en la tasa de lipólisis y en la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF-α en tejido adiposo [12, 24]. Los ácidos grasos así generados pueden estimular procesos inflamatorios

activando la vía del receptor de tipo Toll (TLR2-4). En ese sentido, se ha establecido una correlación entre el incremento de la lipólisis y el reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo [25]. En suma, se sugiere que ambos procesos característicos de la obesidad (como son la inflamación del tejido adiposo y el aumento del eflujo de ácidos grasos) participan en la generación de las complicaciones asociadas a la misma (figura 4).

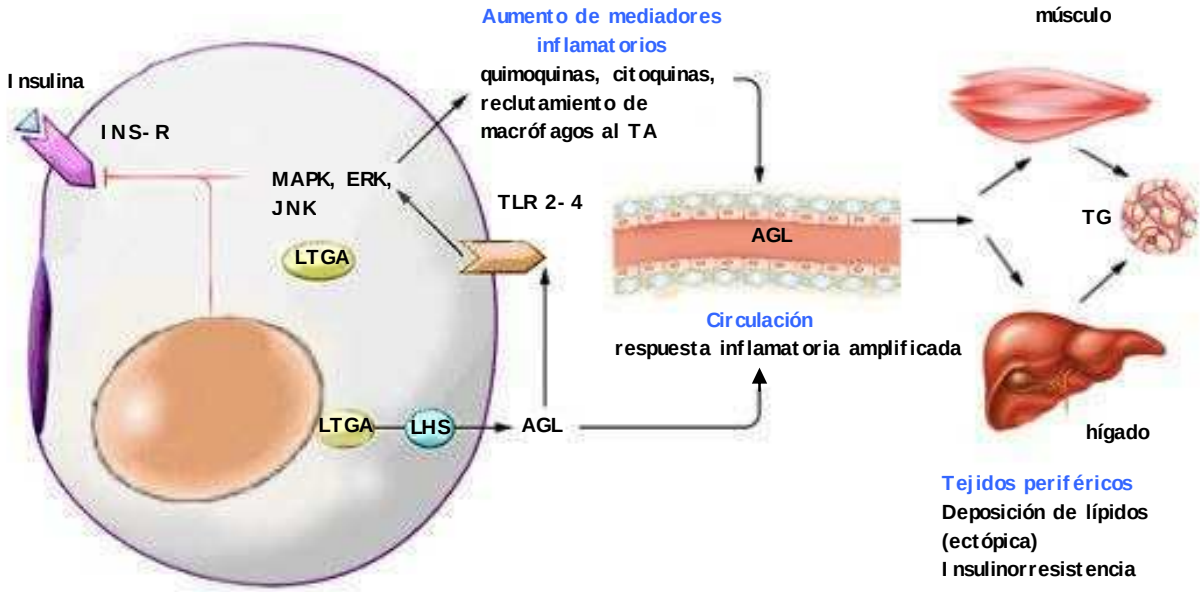


Figura 4: ***Asociación entre la inflamación del tejido adiposo y el desarrollo de la insulinorresistencia*** *(adaptado de [26]). LTGA: lipasa de triglicérido del tejido adiposo; LHS: lipasa hormonosensible; AGL: ácidos grasos libres; MAPK, ERK, JNK: mediadores de la vía de las MAP quinasas; TLR2-4: receptores Toll de tipo 2 y 4; TG: triglicéridos; INS-R: receptor de insulina; TA: tejido adiposo.*

Modelos animales de insulinorresistencia

Los roedores han sido utilizados por años como modelo de distintas enfermedades humanas, especialmente en el caso de hipertensión, diabetes y obesidad [27, 28].

Algunos modelos de diabetes u obesidad se basan en alteraciones genéticas, como los de las ratas Zucker (que presentan una mutación en el receptor para leptina) u Otsuka Long-Evans Tokushima (que carecen del receptor de colecistoquinina 1 en los acinos pancreáticos) y los ratones *db/db* o los ratones *ob/ob* (que carecen del receptor o son deficientes en la producción de leptina respectivamente). Si bien estos modelos son útiles para evaluar mecanismos moleculares específicos involucrados en el desarrollo de obesidad y/o hiperglucemia, presentan un valor relativo para el estudio holístico del síndrome de IR.

La dieta juega un rol clave en el crecimiento y el desarrollo del individuo, siendo un factor determinante de su estado nutricional. Actualmente las dietas de gran parte de los habitantes de los países occidentales son ricas en carbohidratos simples (como fructosa y sacarosa) y en grasas saturadas. Este aumento en la ingesta calórica ha sido asociado con la generación de obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y esteatosis hepática no alcohólica [29]. Precisamente los modelos animales que mejor se ajustan al estudio del síndrome de IR se basan en dietas hipercalóricas. La combinación de carbohidratos con una dieta rica en grasas ha sido ampliamente utilizada en roedores para reproducir signos y síntomas de síndrome metabólico humano [30].

La alimentación de ratas macho con una dieta rica en sacarosa constituye un modelo de síndrome de IR de fácil preparación y manejo [31]. En modelos similares (síndrome metabólico inducido por fructosa) se observa IR, hipertensión y dislipidemia así como la generación de inflamación y estrés oxidativo [32]. La fructosa, a diferencia de la glucosa,

no estimula la secreción de insulina en las células β pancreáticas, ya que las mismas carecen del transportador de fructosa (GLUT-5). Por otra parte, la fructosa no estimula la secreción de leptina del tejido adiposo pero si es capaz de activar la lipogénesis hepática. Esta hexosa, puede ser sustrato de la hexoquinasa en una reacción en la que se genera fructosa-6 fosfato (sustrato de la fosfofructoquinasa, punto de control metabólico) o puede ser sustrato de la fructoquinasa y originar fructosa-1 fosfato (vía cuantitativamente más importante). En este último caso, la incorporación de la fructosa a la glucólisis, evita el punto de control de la vía, lo que conlleva un aumento descontrolado de la generación de piruvato y de la síntesis de ácidos grasos a nivel hepático [33].

La administración de una dieta rica en sacarosa (DRS) a ratas induce lipogénesis en el tejido adiposo epididimario [34] que se acompaña de un aumento en los niveles séricos de insulina, leptina, TG, glucosa y ácidos grasos libres. Se genera además un estado de tolerancia alterada a la glucosa con aumento en la presión sistólica y desarrollo de esteatosis hepática [35].

Glucocorticoides

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas que cumplen funciones en el crecimiento y desarrollo celular y ejercen efectos sobre la regulación de la presión sanguínea, del balance hídrico y salino, de la función inmune y del metabolismo energético. Estas acciones resultan esenciales para la supervivencia, sobre todo en situaciones de estrés.

En el corto plazo, estos efectos contribuyen a distintas respuestas adaptativas. Por ejemplo los glucocorticoides incrementan la disponibilidad de sustratos para la oxidación celular (glucosa, aminoácidos y ácidos grasos). Sin embargo, el exceso crónico de glucocorticoides, que recibe en medicina la denominación de síndrome de Cushing, incrementa la morbilidad y mortalidad a través de una variedad de factores, incluyendo

obesidad, osteoporosis, hipertensión, hiperglucemia y una capacidad de respuesta disminuida a las infecciones [36].

Síntesis de glucocorticoides

Los glucocorticoides son sintetizados en la corteza de las glándulas adrenales o suprarrenales, estructuras pares que se encuentran ubicadas (en los mamíferos) en el polo superior o anterior de cada uno de los riñones. Cada glándula está recubierta por una cápsula de tejido conectivo y se compone de dos regiones que difieren en su origen, función y estructura: la *médula* que es central, de origen neuroectodérmico y la *corteza* que es externa, de origen mesodérmico. La función principal de la médula es la síntesis y secreción de catecolaminas. La corteza, a su vez, se subdivide en tres capas concéntricas denominadas *zona glomerulosa*, *zona fasciculata* y *zona reticularis* en las cuales se sintetizan distintos compuestos derivados del colesterol (figura 5).

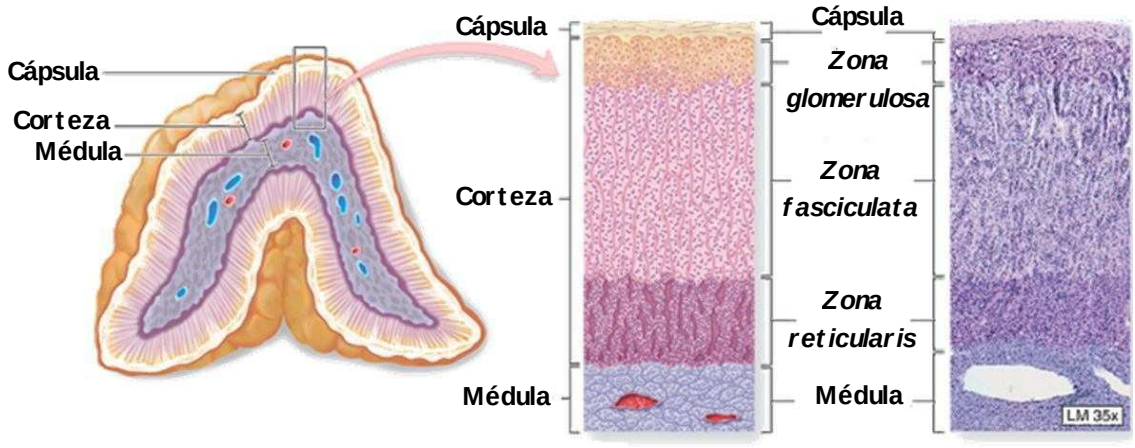


Figura 5 : ***Estructura y morfología de las glándulas adrenales***

La *zona glomerulosa* secreta mineralocorticoides cuya función fundamental es la de mantener el equilibrio hidrosalino, mientras que la *zona fasciculata* secreta glucocorticoides, mediadores de la respuesta al

estrés: el cortisol (en humanos) y la corticosterona (en roedores). Por último, la *zona reticularis* es fuente de andrógenos de potencia relativamente baja como la Δ4-androstenediona, la dehidroepiandrosterona y su derivado sulfatado.

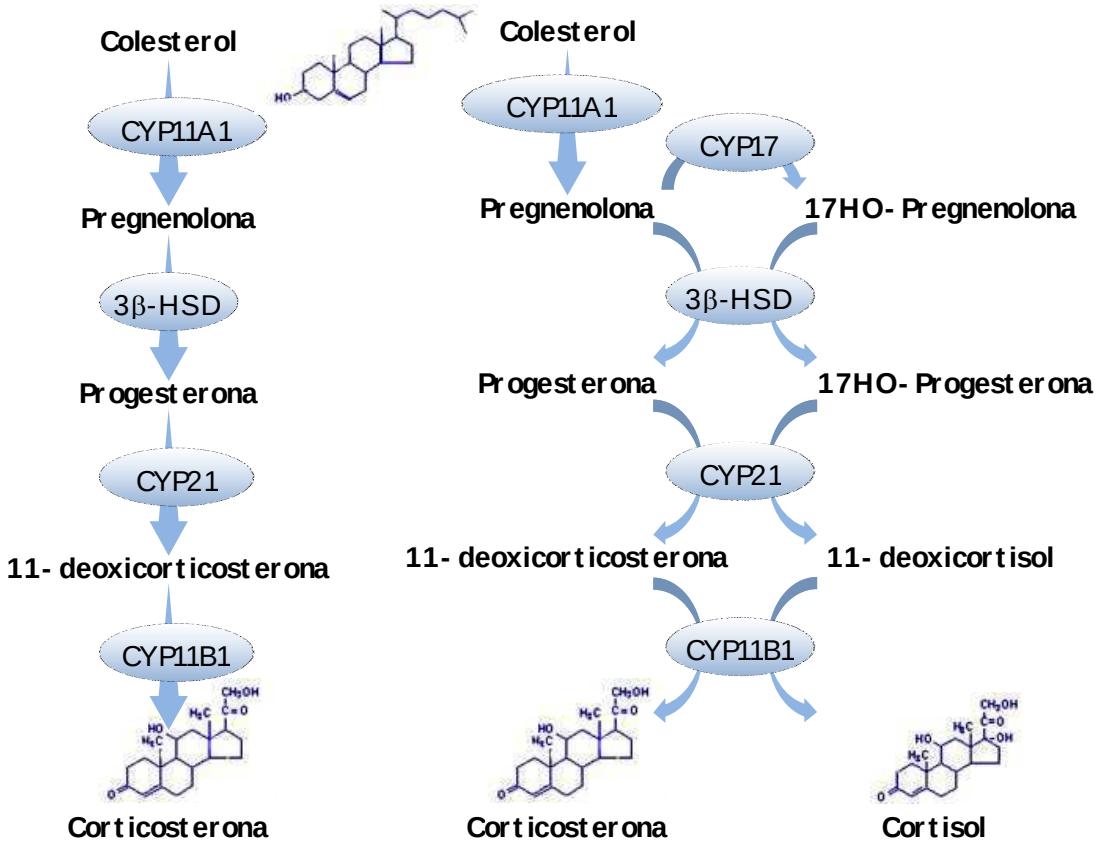


Figura 6: ***Síntesis de glucocorticoides en la zona fasciculata y reticularis de la corteza adrenal.*** *En panel de la izquierda se representa la síntesis en roedores y en el panel de la derecha el de humanos: CYP11A1: Citocromo P450 scc; 3βHSD: 3 beta hidroxi esteroide deshidrogenasa.*

Regulación de la secreción de glucocorticoides

La hormona adrenocorticotrofina (ACTH) es el principal factor regulador de la función adrenal. Esta hormona es sintetizada por las células corticotropas de la adenohipófisis como producto del clivaje proteolítico de la proopiomelanocortina (POMC). La síntesis de POMC, sus modificaciones post traduccionales y la secreción de ACTH son reguladas por la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y en menor medida por la vasopresina (VP), ambas sintetizadas en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). En rata la POMC es una proteína de 235 aminoácidos cuyo clivaje, en forma tejido específica, produce diversos péptidos bioactivos que son secretados junto con la ACTH. Entre ellos se encuentran las β-lipotropinas, las β-endorfinas y la hormona estimulante de los melanocitos (MSH). Los glucocorticoides regulan negativamente la síntesis de CRH y de ACTH a nivel hipotalámico y adenohipofisario respectivamente por un mecanismo de retroalimentación negativo.

El receptor de ACTH (receptor de melanocortina tipo2 ó MC2R) en la corteza adrenal es una proteína con siete dominios transmembrana que está acoplada a proteína G estimulatoria (Gs). Si bien se expresa principalmente en la corteza adrenal, también se lo puede encontrar en piel y en tejido adiposo. La activación de esta vía de señalización lleva a un incremento en los niveles intracelulares de AMPc y a la activación de la proteína quinasa A (PKA). La ACTH en la *zona fasciculata* de la corteza adrenal estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores). La proteína StAR (proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda) está involucrada en el paso regulatorio clave de la esteroidogénesis ya que participa (junto con otras proteínas como la proteína transportadora, TSPO) del transporte del colesterol hacia la membrana mitocondrial interna, paso limitante de la síntesis de glucocorticoides. Una vez allí, el colesterol es transformado en

pregnenolona por acción del citocromo CYP11A1. En forma aguda, ACTH activa la hidrólisis de los ésteres de colesterol (acumulados en gotas lipídicas en el citosol), el *uptake* de colesterol de las lipoproteínas plasmáticas y el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna [37]. A mediano plazo, la adrenocorticotrofina (ACTH) induce también la expresión génica de StAR junto con otras enzimas involucradas en la esteroidogénesis en la glándula adrenal incrementando así la síntesis de glucocorticoides. Si el estímulo se prolonga en el tiempo, la ACTH genera hipertrofia e hiperplasia del tejido corticoadrenal.

La ACTH también puede actuar sobre la *zona glomerulosa* y *reticularis* estimulando la producción de mineralocorticoides y de andrógenos adrenales, respectivamente.

Las interacciones funcionales entre el sistema inmune y el eje HHA han sido ampliamente demostradas [38, 39]. La activación del sistema inmune promueve un aumento en los niveles de CRH y ACTH, y ciertas citoquinas u otros mediadores inflamatorios pueden actuar directamente a nivel adrenal modulando la biosíntesis de esteroides.

También pueden generarse citoquinas en la glándula adrenal, en las propias células esteroidogénicas, y en las células inmunes locales. En condiciones normales, la glándula adrenal está extensamente infiltrada por macrófagos que se encuentran principalmente en la *zona reticularis*, cerca de la médula. Estos macrófagos tienen la capacidad de secretar una variedad de citoquinas como IL-1, IL-6 y TNF-α o péptidos entre los que se encuentran VIP y TGF-ß. El control intraadrenal suele completarse con la regulación de la actividad de los macrófagos por vía simpática y con la inhibición de la secreción de citoquinas por el cortisol. Las células adrenales también pueden producir IL-1, IL-6, IL-18 y TNF-α al ser estimuladas por diversos factores como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y la angiotensina II entre otros [40, 41] (figura 7).

Además de las citoquinas, se ha postulado que otros moduladores de la esteroidogénesis podrían actuar en forma autocrina y/o parácrina. Entre ellos se pueden mencionar a los productos derivados de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) [42, 43], la ciclooxigenasa (COX) y la hemooxigenasa (HO) [44-46] que modularían la esteroidogénesis adrenal evitando respuestas de tipo todo o nada.

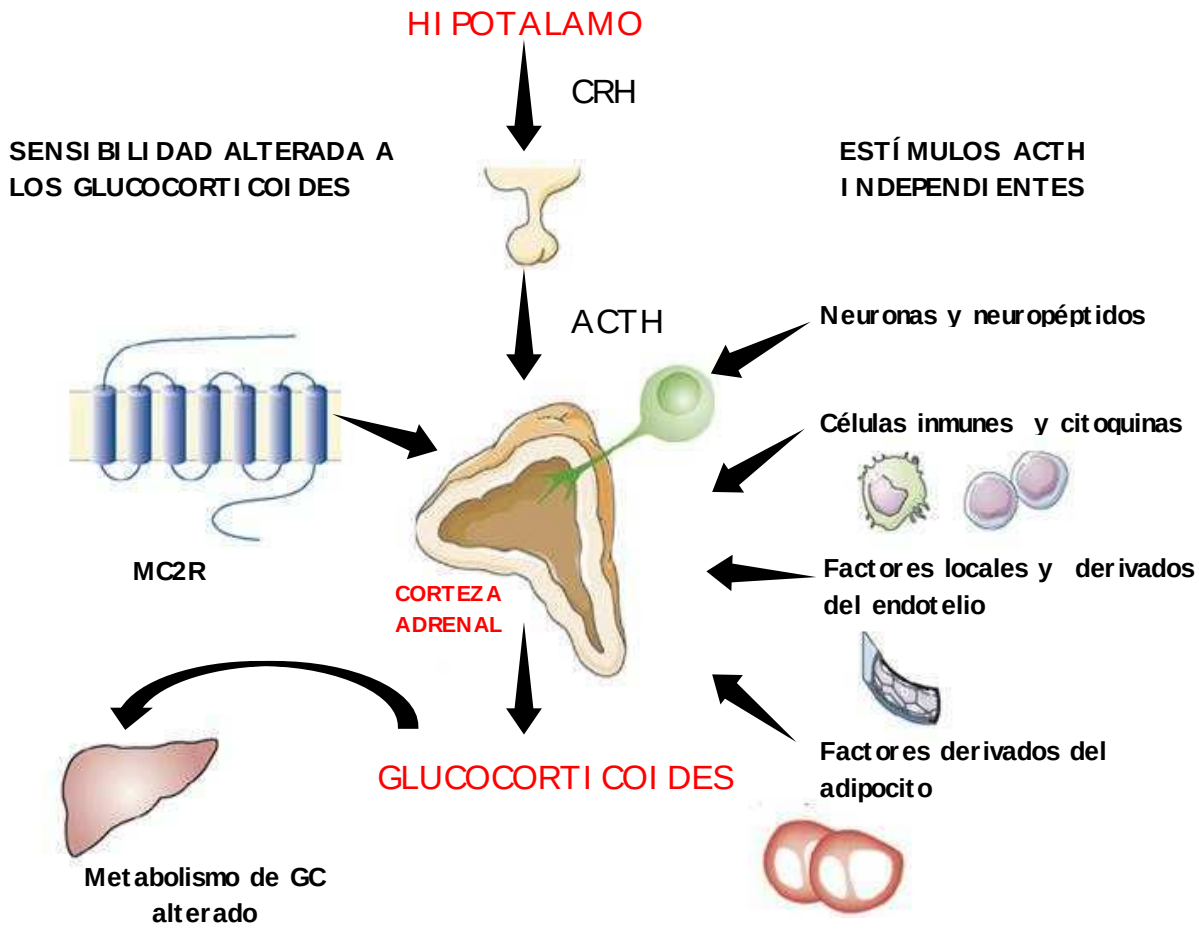


Figura 7: ***Regulación del eje hipotálamo hipófiso adrenal.*** *MC2R (receptor de melanocortina tipo 2): receptor de ACTH, GC: glucocorticoides; ACTH: adenocorticotrofina; CRH: hormona liberadora de corticotrofina.*

Sistema de la óxido nítrico sintasa (NOS)

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso y altamente reactivo que desempeña un papel relevante en la regulación de diversos

mecanismos fisiológicos y patológicos en los sistemas nervioso, cardiovascular, respiratorio, digestivo, endocrino e inmune. La producción de NO es catalizada por una familia de enzimas llamada óxido nítrico sintasa (NOS) de la que se conocen tres isoformas, cada una de ellas codificada por un gen distinto y con expresión diferencial en distintos tejidos.

La NOS neuronal (nNOS o NOS 1) es predominantemente citosólica y se expresa principalmente en neuronas del sistema nervioso central y periférico, músculo esquelético, islotes pancreáticos, mácula densa y endometrio. Está involucrada en la neurotransmisión, en la motilidad intestinal y en la interacción túbulo-glomerular renal. La NOS endotelial (eNOS o NOS 3) se encuentra predominantemente en la fracción particulada y se expresa principalmente en endotelio, cerebro y epitelio. Uno de sus principales mecanismos de acción involucra la activación de la guanilato ciclasa soluble con la consecuente generación de GMPc. La actividad de eNOS está involucrada en procesos de relajación vascular, adhesión plaquetaria, agregación y angiogénesis. Ambas isoformas son de expresión constitutiva. Por el contrario, la expresión de la NOS inducible (iNOS o NOS 2) es estimulada por la acción de endotoxinas y de citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF-α. De esta forma la iNOS participa en los mecanismos de respuesta antimicrobiana y en respuestas inflamatorias y de citotoxicidad. Estos efectos son independientes del GMPc y son el resultado de la interacción del NO con metales de transición, grupos tioles y con otros radicales libres como el anión superóxido. Esta isoforma es de ubicación tanto citosólica como particulada y se expresa fundamentalmente en macrófagos, corazón, hígado, músculo liso y endotelio [47].

En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos que el NO generado por la actividad de la NOS es un modulador de la esteroidogénesis adrenal [48]: los dadores de NO y la L-arginina disminuyen significativamente la síntesis de esteroides en este tejido por

un mecanismo independiente de la formación de GMPc y que implica la interacción de NO con el citocromo CYP11A1. En base a estas evidencias, se ha postulado al NO como un modulador negativo en condiciones basal y estimulada de la esteroidogénesis adrenal. En forma análoga se ha demostrado que el NO inhibe la esteroidogénesis tanto en células de la granulosa, luteales y de la línea de Leydig MA-10 como en células de Leydig de ratas estimuladas con hCG [49, 50].

Sistema de las ciclooxigenasas (COX)

La actividad de ciclooxigenasa cataliza la conversión de ácido araquidónico a prostaglandina H_2, que es convertida por otras enzimas en otras prostaglandinas, prostaciclinas y tromboxanos. Se han descripto 3 isoenzimas de COX: COX-1, COX-2 y COX-3, que difieren tanto en su localización como en sus niveles de expresión. COX-1 se expresa constitutivamente y su activación induce la producción de prostaciclinas, que tienen funciones vasculares antitrombogénicas [51] y citoprotectoras en la mucosa gástrica [52]. COX-2 es la isoforma inducible de las ciclooxigenasas y su activación ocurre en respuesta a agentes pro-inflamatorios como las citoquinas, los mitógenos y las endotoxinas [53]. COX-3 ha sido propuesta como una variante del *splicing* de COX-1, con alta expresión en cerebro y médula espinal y su función es aún motivo de debate [54].

En cuanto al rol de la ciclooxigenasa en la regulación de la fisiología adrenal, en un trabajo reciente de nuestro laboratorio demostramos que la incubación con LPS de células tumorales adrenales de ratón (línea Y1) produce un aumento en los niveles de glucocorticoides [55]. Por otra parte el tratamiento con LPS también produce un aumento de la expresión de COX-2 (por activación de la vía NFκB) y la inhibición farmacológica de COX-2 conlleva una disminución en los niveles de glucocorticoides. En base a

esto, postulamos a la COX-2 como un modulador positivo de la esteroidogénesis adrenal.

Sistema de las hemooxigenasas (HO)

La hemooxigenasa (HO) es una enzima microsomal que cataliza el clivaje oxidativo del grupo hemo, en presencia de NADPH, de la citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH y de $O_{2,}$ con generación de monóxido de carbono (CO), biliverdina (luego transformada por acción de la biliverdina reductasa en bilirrubina) y liberación de hierro.

Se han identificado tres isoformas de HO producto de tres genes distintos: una inducible (HO-1) y dos constitutivas (HO-2 y HO-3) [56, 57]. Si bien se ha demostrado que tanto HO-1 como HO-2 catalizan la degradación del hemo, la función más probable de la HO-3, dada su baja actividad enzimática, sería la de un biosensor de hemo. Por técnicas de inmunolocalización se ha demostrado que la enzima HO-2 se expresa basalmente en diversos tejidos, incluyendo cerebro, sistema nervioso, hígado, riñón, vasculatura y testículos [58, 59]. Se cree que dado que su expresión no varía, la HO-2 podría jugar un rol como regulador de los niveles de hemo intracelulares o como un sensor de oxígeno. La HO-1, también conocida como la HSP32 (proteína de choque térmico de 32 kDa), está presente en condiciones normales en hígado y bazo, donde participa de la degradación del grupo hemo de hemoproteínas. No obstante, puede observarse un aumento en su expresión en una amplia variedad de tejidos frente a estímulos estresantes como metales pesados, choque térmico, disminución en los niveles de glutatión reducido, radiación UV, endotoxinas y citoquinas, hipoxia, hiperoxia, dadores de NO y peroxinitritos, su propio sustrato (el hemo) y varias hemoglobinas [58, 60, 61].

En base a estos hallazgos, se ha propuesto que la inducción de HO-1 forma parte de un mecanismo de defensa celular y tisular frente a

situaciones de injuria tisular. Esta hipótesis es sostenida por numerosas evidencias experimentales, tales como las investigaciones llevadas a cabo en ratones *knock-out* para HO-1, los cuales son más sensibles al daño causado por LPS, exhiben una baja tolerancia al estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno, hemina y endotoxina), anormalidades severas en el crecimiento, anemia, daño endotelial y deposición de hierro hepático y renal [62]. Un fenotipo similar se observa en la deficiencia de HO-1 humana, con un marcado retardo del crecimiento, anemia, y sensibilidad extrema a los oxidantes [63].

En general la función protectora de la HO-1 es atribuida al aumento del metabolismo del hemo que es prooxidante, a la producción concomitante de los antioxidantes biliverdina y bilirrubina, al mediador gaseoso vasoactivo CO y al hierro, un regulador génico.

En nuestro laboratorio hemos detectado la expresión de HO-1 y HO-2 en células tumorales adrenales de ratón (línea Y1) así como en ratas y demostramos la inducción de HO-1 por ACTH. Análogamente a lo demostrado en el caso del NO, la esteroidogénesis se incrementa significativamente en las células Y1 cuando se inhibe la actividad de la hemooxigenasa en forma competitiva mediante el tratamiento con estaño protoporfirina IX [45, 64].

Resistencia a la insulina y eje hipotálamo- hipófiso – adrenal (HHA)

Se ha demostrado que diversas hormonas como los glucocorticoides, la hormona de crecimiento, los esteroides sexuales y las catecolaminas tienen efectos marcados sobre la sensibilidad a insulina en diversos tejidos. En particular, los glucocorticoides, en dosis elevadas, son potentes promotores de IR, y favorecen el depósito de grasa visceral por su efecto inductor sobre la lipoproteína lipasa de los capilares del tejido adiposo intraabdominal [65-67]. En ese sentido, estudios en primates han demostrado que la exposición crónica al estrés físico y psicológico se

caracteriza por un aumento en el depósito de grasa visceral, IR, hiperinsulinemia, tolerancia alterada a la glucosa, dislipidemia y aterosclerosis prematura. Todas estas anormalidades se asociaron con una mayor respuesta a la estimulación con ACTH y con hipertrofia adrenal [68, 69]. En ratas genéticamente obesas (Zucker) se ha demostrado un incremento de los niveles basales de corticosterona y un retraso en la normalización de los valores luego de un reto estresante [70].

Evidencias de estudios epidemiológicos *(revisados en* [67]*)* indican una asociación positiva entre los niveles de cortisol y las características más notables del síndrome metabólico, particularmente la IR y el perfil lipídico alterado en humanos. La hipersecreción de glucocorticoides está asociada con la obesidad idiopática, especialmente de distribución central [71]. Estas evidencias, junto al hecho de que el bloqueo de receptores esteroideos (glucocorticoideos / progestacionales) con RU-486 mejora la IR inducida en animales por una dieta rica en grasas [72] sugieren fuertemente la participación de la corteza suprarrenal en el desarrollo del síndrome de IR.

A la fecha existen muy pocos trabajos que analizan el efecto directo de la insulinorresistencia sobre la funcionalidad del eje hipotálamo hipófiso adrenal (HHA) y en particular ninguno, a nuestro conocimiento, evalúa el impacto de la IR sobre la glándula adrenal en un modelo de insulinorresistencia inducido por dieta.

Se ha descripto que la hiperactivación de la corteza suprarrenal que se observa en el síndrome de IR puede ser consecuencia de un estímulo central, con mayor liberación de ACTH [70], atribuible a un estado de estrés crónico [67]. Otra posibilidad, menos estudiada, involucra el estímulo de la corteza adrenal por mediadores circulantes (hormonales/ humorales) asociados al estado de IR y provenientes, por ejemplo, del tejido adiposo. En este sentido se han publicado numerosos trabajos sobre el efecto estimulatorio directo del TNF-α sobre hipotálamo/ hipófisis e inhibitorio sobre la corteza suprarrenal [73], así

como resultados que indican el efecto inhibitorio de la leptina sobre la producción *in vitro* de glucocorticoides [74]. Por otra parte, se ha demostrado que la infusión intrahepática de ácidos grasos libres (como el oleato por ejemplo) puede generar hipercorticosteronemia [75] ya sea actuando directamente sobre las células adrenocorticales o bien a través de mecanismos centrales [76]. La hiperinsulinemia también induce la activación del eje corticosuprarrenal [77] y aumenta la esteroidogénesis en forma directa o a través de receptores para IGF-1 [78].

Enfoques terapéuticos para el tratamiento de la insulinorresistencia

En los últimos años se desarrollaron varias estrategias para el tratamiento del síndrome de IR. Estas involucran cambios en el estilo de vida orientados al descenso de peso con la implementación de una dieta hipocalórica, rica en fibras y un régimen de ejercicio físico así como también la administración de fármacos como las biguanidas (por ejemplo metformina) y las tiazolidinedionas (por ejemplo rosiglitazona).

A) Enfoque farmacológico

Las tiazolidinedionas (TZD), también llamadas glitazonas, son una clase de fármacos insulinosensibilizadores que se utilizan en el tratamiento de la *diabetes mellitus* tipo 2. Fueron identificadas como ligandos de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs, de la superfamilia de receptores nucleares) en roedores recién en 1990.

Los PPARs son activados por ligandos lipofílicos pequeños y son estructuralmente similares al receptor de hormona tiroidea. Se han descripto 3 subtipos: α, β/δ y γ. Cada uno de ellos media la acción fisiológica de una amplia variedad de moléculas (ácidos grasos y moléculas derivadas).

Las diferentes isoformas de los PPARs difieren en su localización tisular y en su función: PPAR-α se expresa predominantemente en el hígado y en menor medida en el músculo, corazón y hueso; PPAR-δ es de expresión ubicua y PPAR-γ, que a su vez presenta 4 isoformas, se expresa en corazón, músculo, colon, riñón, páncreas y bazo (γ1), principalmente en tejido adiposo (γ2), en macrófagos, intestino grueso y tejido adiposo blanco (γ3) y en células endoteliales (γ4).

Mecanismo de acción de los PPARs

Los PPARs son receptores nucleares que, formando un heterodímero con el receptor del ácido retinoico X (RXR), actúan como factores de transcripción uniéndose a elementos de respuesta en el ADN [79] y regulando la expresión de genes involucrados en el metabolismo energético.

La activación de la vía de PPAR también puede ejercer represión transcripcional por interacción con otros factores de transcripción como NFκB, STAT-1 y AP-1. En ausencia de ligando, los heterodímeros están asociados a un complejo co-represor que bloquea la transcripción.

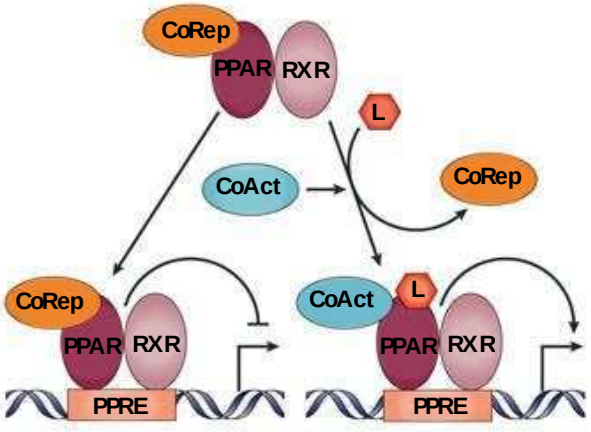


Figura 8: ***Mecanismo de acción de los PPARγ.*** *(Adaptado de [80]). PPAR: receptores activados por proliferadores de peroxisomas; RXR: receptor del ácido retinoico; CoAct: co-activador; L: ligando; CoRep: co-represor PPRE: elemento de respuesta a los receptores activados por proliferadores de peroxisomas.*

Mecanismo de acción de las tiazolidinedionas

Las tiazolidinedionas (TZDs) fueron descubiertas durante un *screening* de compuestos desarrollados con el fin de disminuir los niveles sanguíneos de lípidos. Como resultado de la investigación preclínica, se han descripto efectos hipoglucemiantes e hipoinsulemiantes de las mismas en diversos modelos animales de IR. Existen diversos tipos de TZDs (troglitazona, pioglitazona, rosiglitazona, entre otras) que difieren entre sí en la estructura de sus cadenas laterales [81]. Las TZDs son ligandos preferenciales del receptor nuclear PPARγ [82] y modulan la transcripción de sus genes blanco [83, 84].

La adipogénesis es el proceso de diferenciación de la célula precursora preadipocitaria al adipocito maduro, capaz de producir hormonas lipídicas y citoquinas. Está descripto que la activación de PPAR-γ induce el arresto del crecimiento celular, y promueve la adipogénesis en líneas celulares de fibroblastos en crecimiento exponencial, demostrando su rol crítico en la regulación de la diferenciación adipocitaria [85]. En forma paralela, las TZDs son capaces de incrementar la expresión de numerosos genes, entre ellos los que codifican para la glicerol fosfato deshidrogenasa, el transportador de glucosa GLUT-4 y la proteína de unión de ácidos grasos aP2 [86].

Los PPAR-γ promueven también la lipogénesis y el metabolismo de glúcidos induciendo la expresión de genes como el de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), la acil-CoA sintasa y la lipoproteína lipasa (LPL). Diversos autores han demostrado que los PPAR-γ regulan también la expresión de la proteína transportadora de ácidos grasos FATP-1 y del transportador de ácidos grasos CD36, ambas proteínas involucradas en el ingreso de lípidos al adipocito [87].

En ratas obesas Zucker, la administración de troglitazona durante 15 días incrementa 4 veces el número de adipocitos pequeños, tanto en tejido adiposo subcutáneo como retroperitoneal, y disminuye aproximadamente a la mitad el número de adipocitos grandes [88]. Estos efectos se asociaron a un aumento de 2.5 veces en los procesos apoptóticos y a una reducción en la expresión de TNFα y leptina en el tejido adiposo. La rosiglitazona aumenta la diferenciación de células madre de tejido adiposo subcutáneo humano a adipocitos, sin afectar a las células madre del tejido adiposo visceral [89].

Efecto de las TZDs sobre la IR

Las TZDs han demostrado ser muy efectivas en mejorar la insulinosensibilidad en modelos animales de IR. Dado que el blanco principal de las TZDs es el tejido adiposo y que la cantidad de receptores PPAR-γ en músculo es un décimo de la presente en el tejido adiposo, se ha especulado que el aumento sistémico en la sensibilidad a la insulina es secundario a la acción de PPAR-γ en tejido adiposo [90]. Los efectos de las TZDs provocando la disminución de la liberación de ácidos grasos y de TNF-α desde el tejido adiposo o induciendo la redistribución de la masa grasa desde los depósitos lipídicos visceral, hepático e intramuscular al depósito subcutáneo podrían ser responsables del efecto insulinosensibilizador de las mismas. Sin embargo, un efecto directo de las TZDs sobre el músculo no puede ser descartado.

Efecto de las TZDs sobre la dislipidemia asociada a la IR

Los pacientes con diabetes tipo 2 e IR presentan niveles elevados de TG séricos y disminuidos de colesterol-HDL [91, 92]. Si bien los niveles plasmáticos de colesterol-LDL no se ven modificados, estás partículas

suelen ser de menor tamaño y más densas [93]. Estas LDL pequeñas y densas son más susceptibles a la oxidación y a la glicación, y penetran con mayor facilidad en el endotelio. Estos cambios están asociados con un aumento en la incidencia de la enfermedad cardiovascular. El desarrollo de un estado de IR acompañado de una elevación en los niveles de glucosa provoca además un aumento en las VLDL, promoviendo un incremento aún mayor de los niveles de TG plasmáticos. El tratamiento de pacientes con diabetes tipo 2 con TZDs mejora la mayoría de estas anormalidades lipídicas. La administración de rosiglitazona, por ejemplo incrementa los niveles de colesterol-HDL sin modificar los niveles de TG plasmáticos en estos pacientes [94].

Las TZDs son poco efectivas para el control glucémico a menos que la secreción de insulina endógena sea adecuada. De no ser así, la secreción de insulina debe ser estimulada por secretagogos o reemplazada por insulina exógena [95].

Efecto de las TZDs sobre el estrés oxidativo y la inflamación asociada a la IR

Las TZDs inhiben la formación de radicales lipídicos (que generan los productos tóxicos 4-hidroxinonenal y nitrotirosina) y disminuyen los niveles de iNOS en el hígado de ratas espontáneamente hipertensas [96]. También se demostró la inducción de glutatión peroxidasa 3 por una TZDs (vía PPAR γ) en células de músculo esquelético [97].

Por otra parte, las TZDs mejoran el perfil proinflamatorio plasmático (por ejemplo aumentando los niveles de IL-6) [98] y disminuyen el reclutamiento de macrófagos proinflamatorios al tejido adiposo [99] en modelos animales de IR. Además, el tratamiento con rosiglitazona demostró ser efectivo para disminuir la infiltración de linfocitos T en el tejido adiposo de animales con IR [100].

B) Enfoque fisiológico: *El rol del ejercicio en la insulinosensibilidad*

El ejercicio puede definirse como una actividad corporal que se realiza de manera repetitiva para mejorar o mantener uno o más componentes del estado físico [101]. Puede ser clasificado por el tipo, la intensidad y la duración de la actividad. La actividad física regular promueve el *turnover* energético, lo que a su vez estimula la pérdida de peso. Sin embargo, independientemente de los cambios en los depósitos lipídicos, el ejercicio ha demostrado tener un efecto positivo sobre la regulación de la homeostasis glucémica tanto en personas sanas como en pacientes con diabetes tipo 2 [102, 103].

Efecto de la actividad física sobre la IR

El efecto insulinosensibilizador de la actividad física fue demostrado por Richter *et al*. por primera vez en ratas en 1982. En este estudio se observó que luego de una sesión de ejercicio físico, el músculo de los animales mostraba una mayor sensibilidad al efecto estimulador de la insulina sobre la entrada de glucosa, y un incremento en la síntesis de glucógeno [104].

Se ha sugerido que el efecto de la actividad física sobre la sensibilidad a la insulina a nivel muscular se debe a un mecanismo inducido por la contracción local. En este sentido, se observó que el efecto insulinosensibilizador del ejercicio pudo ser reproducido en músculo aislado generando su contracción mediante la estimulación eléctrica del nervio ciático [105]. Se estableció una correlación entre el incremento en la insulinosensibilidad y el aumento en el número de transportadores GLUT-4 en membrana [106].

Numerosos estudios en humanos demostraron que el efecto insulinosensibilizador del ejercicio (luego de 3-4 horas) no se relaciona con

la estimulación de la vía de transducción de señales de la insulina desde el receptor hasta la activación de PI3K [107, 108] ni tampoco con la modificación de la localización subcelular de los intermediarios de la vía, ya que no se observaron cambios en la localización de receptor de insulina ni de IRS-1, Akt y GSK-3 luego de 1 hora de ejercicio [109]. Alternativamente se postuló que el ejercicio genera un incremento en la translocación de los GLUT-4 a la membrana por un mecanismo alternativo. Se han caracterizado diversas moléculas de la vía de señalización de insulina que se activan luego de la fosforilación de PI3K. En particular, la proteína quinasa C atípica (aPKC) y el sustrato de 160 kDa de Akt (AS160) juegan un rol clave en el ingreso de glucosa estimulado por insulina [110, 111]. Se considera actualmente que la proteína AS160, en el estado basal no fosforilado, inhibe la translocación de GLUT-4. Su fosforilación por Akt en respuesta a la estimulación por insulina favorece la translocación de GLUT-4. Durante la contracción muscular AS160 también es fosforilada, pero por acción de la AMPK [112, 113]. El ejercicio moderado, por lo tanto, es capaz de inducir un efecto estimulatorio, tiempo dependiente, en la fosforilación de AS160 en músculo [114] y en la translocación de GLUT-4.

Si bien el rol de aPKC en la regulación de la translocación de GLUT-4 aún no está del todo claro, diversas líneas de evidencia plantean que su activación es clave tanto en el proceso de translocación como en el de anclaje y fusión de los GLUT-4 con la membrana celular [115]. En ese sentido, en tejido muscular esquelético se observó un aumento en la actividad de aPKC en respuesta al ejercicio agudo [116].

En cuanto al efecto del ejercicio sobre el tejido adiposo, se ha sugerido que activa la AMPK posiblemente mediante la estimulación adrenérgica [117-119] o alternativamente, por un efecto secundario a la secreción de IL-6 (actuando como mioquina) por el músculo [120]. En el tejido adiposo la AMPK promueve la inhibición de la síntesis de lípidos y el aumento en su oxidación [121]. De esta forma disminuiría el aporte de

ácidos grasos a la sangre lo que favorecería la insulino-sensibilización de tejidos como el músculo esquelético.

Efecto el ejercicio sobre la dislipidemia asociada a la IR

La implementación de un protocolo de ejercicio ha probado ser efectiva para mejorar el perfil lipídico asociado a la insulinorresistencia aumentando los niveles de colesterol HDL y disminuyendo los niveles de VLDL y triglicéridos [122, 123].

Efecto del ejercicio sobre el estrés oxidativo y a la inflamación asociada a la IR

Por otra parte, el ejercicio, mediante la generación de estrés oxidativo, es capaz de inducir mecanismos citoprotectores en diversos tejidos. La producción de niveles bajos o moderados de especies reactivas del oxígeno durante el ejercicio genera cambios favorables como la inducción de enzimas involucradas en mecanismos antioxidantes como ser la Cu/Zn-SOD o la HO-1. En este sentido, Niess et al. demostraron un aumento en los niveles de HO-1 en leucocitos de atletas luego de un ejercicio agudo aunque los niveles basales de HO-1 en reposo eran menores que los de controles no entrenados [124].

Por otro lado diversos autores mostraron que el ejercicio evita la activación de NFκB y disminuye los niveles de marcadores inflamatorios como NAD(P)H oxidasa, PAI-1, MCP-1 y COX-2 en tejido cardíaco [125] y de iNOS y la producción de superóxido en leucocitos $CD34^+$ y $CD34^-$ [126].

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis:

Teniendo en cuenta los resultados de estudios previos presentados en la sección anterior y considerando la utilización del modelo de IR generado por la administración de una dieta rica en sacarosa (DRS) a ratas macho adultas planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

- En los animales que desarrollan IR se detectan, a nivel de la corteza adrenal, cambios que reflejan un estado de inflamación crónica leve y manifestaciones de estrés oxidativo aumentado, con inducción de sistemas antioxidantes

- Estas alteraciones se relacionan con modificaciones en la esteroidogénesis adrenal y con un incremento en la secreción de glucocorticoides

- Los cambios observados en la corteza adrenal de los animales tratados con una DRS son atenuados o anulados por los tratamientos insulinosensibilizadores

Objetivos

Se han observado cambios en los niveles de glucocorticoides en pacientes y en animales con IR, cambios atribuidos a mecanismos centrales.

A su vez, de han descripto modificaciones en mecanismos de regulación del trofismo y de la esteroidogénesis adrenales ligados a IR (por ejemplo ACTH, NOS). Sin embargo, no se han caracterizado aún los cambios morfológicos y funcionales adrenales durante el desarrollo del estado de IR

De acuerdo a lo enunciado anteriormente se plantean como objetivos particulares de este trabajo de tesis:

I. Establecer el marco temporal para el desarrollo de la insulinorresistencia en ratas alimentadas con una dieta rica en sacarosa (DRS) y estudiar sus efectos sobre:

   a. La función y morfología corticosuprarrenal.

   b. La capacidad de respuesta de la adrenal a un pulso de ACTH exógeno.

   c. Los sistemas de señales que operan de forma autócrina y/o parácrina en la corteza adrenal

II. Estudiar el efecto del co-tratamiento con un insulino-sensibilizador (rosiglitazona) sobre los efectos de la DRS sobre los mismos parámetros evaluados en I.

III. Estudiar el efecto de un régimen de ejercicio moderado sobre los efectos de la DRS sobre los mismos parámetros evaluados en I.

Materiales & Métodos

Materiales

La ACTH fue obtenida de Laboratorios ELEA (ACTHelea; Buenos Aires, Argentina). La transcriptasa reversa y la GoTaq® polimerasa se compraron a Promega (Madison, WI, EEUU). El antisuero de corticosterona fue provisto por el Dr. A. Belanger (Laval University, Quebec, Canada). La [$^{1,2,6,7\text{-}3H}$(N)]-corticosterona (0.25 mCi, 76.5 Ci/mmol) fue obtenida en PerkinElmer (Boston, MA, USA). Los kits colorimétricos enzimáticos para la determinación de triglicéridos, glucosa y colesterol fueron comprados en Laboratorios Wiener (Rosario, Argentina). La rosiglitazona fue provista por la Dra Rosana Felice, Glaxo SmithKline, Argentina.

Animales y diseño experimental

En todos los experimentos fueron utilizadas ratas Wistar macho adultas (peso inicial 200-250 g), mantenidas en jaulas grupales (3 animales/jaula) bajo condiciones controladas (temperatura 23 ± 2ºC, ciclo de luz de 7 a 19 h).

Los animales recibieron *ad libitum* una dieta estándar (grasas 8.7g/100g de extrusado, proteínas 24g/100g de extrusado, lisina disponible 4,8g/100g de proteína, calcio 873 mg/100 g de extrusado), y agua corriente (grupo C) o agua suplementada con 30% de sacarosa (p/v) (grupo DRS). Se registraron el consumo calórico (sumando las calorias provenientes del extrusado y las de la solución con 30% de sacarosa) y el peso corporal día por medio durante todos los experimentos realizados.

En la primera serie de experimentos animales de los grupos C y DRS fueron sacrificados en las semanas 3, 5, 7, 9 y 12 luego de comenzada la modificación dietaria. Los animales fueron decapitados cuatro horas después de haber sido retirados el alimento y la bebida (entre las 9 y las 10 h), y se recolectaron muestras de sangre (de las que se separó el suero por centrifugación a 3200 rpm, 15 minutos temperatura ambiente) y de

diversos tejidos, que fueron inmediatamente congeladas. En los siguientes experimentos el tratamiento con DRS se extendió por 7 semanas, lapso tras el cual se constató en forma fehaciente el establecimiento de la IR.

En los experimentos realizados para evaluar el efecto de la tiazolidinediona rosiglitazona (RSG), los animales fueron asignados al azar a uno de cuatro grupos experimentales: a) Control, b) DRS, c) R, controles que recibieron RSG, 4 mg/kg/d por vía oral y d) DRS + R, que recibieron simultáneamente sacarosa y RSG.

En los experimentos diseñados para evaluar el efecto de la actividad física moderada, los animales fueron divididos al azar en 4 grupos experimentales: a) Control b) DRS, c) C + E, controles sometidos a un régimen de ejercicio físico moderado en cinta deslizante y d) DRS + E, que recibieron simultáneamente sacarosa y el régimen de entrenamiento. Los animales fueron sometidos a un período de adaptación al ejercicio, una semana previa al cambio dietario, en el que se los colocó durante 1 minuto sobre la cinta deslizante en movimiento. El régimen de entrenamiento consistió en ejercitar a los animales en la cinta a una velocidad constante de 0.8 km/h con una inclinación de 45º, incrementando el tiempo de ejercicio a lo largo de las semanas de tratamiento hasta llegar a un máximo de 7 minutos en la séptima semana de tratamiento. El régimen de ejercicio se realizó entre las 18 y 19 hs durante 5 días a la semana.

Las determinaciones de glucemia, trigliceridemia y colesterolemia se realizaron mediante kits enzimáticos, de acuerdo a las instrucciones del fabricante en muestras de sangre de animales ayunados durante 4 horas. La funcionalidad y morfología adrenal fueron evaluadas en estos animales en la séptima semana de tratamiento.

Todos los protocolos de experimentación con animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

Test de tolerancia a la insulina intraperitoneal

El test de tolerancia a la insulina fue realizado luego de 6 horas de ayuno mediante la administración intraperitoneal de insulina corriente porcina (Betalin R, Laboratorios Beta, Buenos Aires, Argentina; 0.75 UI/kg). Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la vena de la cola 0, 15, 30, 45 y 60 minutos luego de administrada la insulina. Los niveles de glucosa se determinaron mediante el método colorimétrico de GOD/POD (Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina). Se calculó la pendiente de desaparición de la glucosa (K) para cada animal y se calculó el promedio de las pendientes para cada grupo. Se calculó de manera complementaria para evaluar el estado de insulinorresistencia el índice HOMA-IR. Para ello se tomaron valores de glucemia e insulinemia en los animales con 4 hs de ayuno y se utilizó la siguiente fórmula:

HOMA-IR= (Glucemia * Insulinemia)/ 22,5

Análisis histológico y del contenido lipídico de las glándulas adrenales

Las glándulas adrenales fueron fijadas durante 6 horas en una solución de formaldehído 4% en buffer fosfato 0.1M (pH 7.2), deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol e incluidas en parafina. Sobre cortes de tejido de 5 µm se realizo la coloración topográfica de tricrómico de Masson. En otros casos, las adrenales fueron fijadas en formaldehído 4% en buffer fosfato 0.1M (pH 7.2), y tras ser crioprotegidas mediante una solución de sacarosa 30% en buffer fosfato 0.1M (pH 7.2), fueron incluidas en Tissue-Tek® OCT y congeladas a -20ºC. Se cortaron secciones de 10 µm en un criostato, realizándose la coloración con Sudan III. Todas las imágenes fueron capturadas digitalmente en un microscopio Eclipse E400 (Nikon, Tokyo, Japón) equipado con una cámara fotográfica (Coolpix s10; Nikon, Tokyo, Japón) y fueron procesadas con el

programa Adobe Photoshop SC (Adobe Systems, San José, CA, USA) para ajustar el brillo y el contraste. Para cuantificar el número de células positivas para Sudan III, se tomaron las imágenes de la *zona fasciculata* de la corteza adrenal con un aumento de 600X, se convirtieron a una escala de grises de 8-bits y se estableció manualmente un valor umbral. Finalmente, todas las imágenes fueron convertidas a una forma binaria. El análisis fue realizado por observadores que desconocían el tratamiento aplicado en cada caso. Para el procesamiento y el análisis, las imágenes en formato TIFF fueron transferidas al programa Image J (http://imagej.nih.gov/ij/, NIH, USA).

Para la determinación del contenido de triglicéridos y colesterol tisulares las cortezas adrenales fueron homogeneizadas en buffer fosfato 50 mM pH 7.4 con el agregado de KCl 100 mM y de un cóctel comercial de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma, Aldrich). Las muestras homogeneizadas fueron centrifugadas por 5 min a 2000g; en el sobrenadante se determinó la concentración de triglicéridos y colesterol mediante un kit enzimático colorimétrico (Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina).

Test de estimulación con ACTH exógena

Veinticuatro horas antes del ensayo, se anestesió a los animales con ketamina-xilazina (20 mg/kg- 2 mg/kg) y se les colocó una cánula yugular para la administración de la hormona y la extracción de sangre [127]. El día del experimento, 2 horas antes de la estimulación, se expuso la cánula y se la lavó con una solución de heparina (25 UI/ml) en salina. Las muestras de sangre se obtuvieron 0, 15, 30, 45 y 60 min luego de la aplicación de ACTH (4 UI/kg i.v.).

Aislamiento de ARN y q RT-PCR

Luego del sacrificio, las glándulas adrenales fueron extraídas rápidamente y colocadas en una placa de Petri sobre hielo, sobre la cual fueron descapsuladas y desmeduladas utilizando una lupa (6x). Los tejidos adrenales fueron homogeneizados en TRIzol®, extrayéndose el ARN total según las instrucciones del fabricante. Se realizó el pretratamiento de 1 µg de ARN con deoxirribonucleasa I libre de ribonucleasas para eliminar cualquier posible contaminación con ADN. El protocolo de transcripción reversa consistió en la incubación del ARN durante 1 hora a 42ºC en una mezcla que contenía 0.5 mM de cada dNTP, 25 ng/µl (8 µM) de *random primers*, 1x *first-strand buffer* (5X), 25 U de inhibidor de ribonucleasa, y 200 U de transcriptasa reversa en un volumen final de 25 µl. La reacción se detuvo por calentamiento a 90ºC durante 5 min. La mezcla de reacción fue llevada luego a 100 µl con agua libre de ARNasas (tratada con dietilpirocarbonato) y almacenada a -70ºC. Para evaluar la posible contaminación con ADN genómico, en determinados tubos se omitió la colocación de transcriptasa reversa. La amplificación por PCR en tiempo real fue realizada en un termociclador Rotor-Gene™ 6000 ©Corbett Life Science (Corbett Research, Sidney, Australia) utilizando 0.5 µl de ADNc en un volumen final de 25 µl en una mezcla de reacción conteniendo: 1x PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP, 500 nM de cada primer específico, 0.625 U polimerasa GoTaq® y 0.96 x EvaGreen®.

Las secuencias de los primers utilizados se indican en la Tabla I

	Primer forward	***Primer reverse***
ß actina	5´ -CCACACCCGCCACCAGTTC-3´	5´ -GACCCATTCCCACCATCACACC -3´
CYP11A1	5´ -GGGTGGCCTATCACCAGTAT-3´	5´ -CTGAGCTACACCTTCCAGCA-3´
StAR	5´ -GTGGAACCCAAATGTCAAGG-3´	5´ -CAGCACACAGGTGGAACCTC-3´

MC2R	5´ -GATGCTGGTTTTTATCCTGTGTC-3´	5´ -ATGC CATTGACCTGGAAGAG-3´
PPARγ	5´ - CATAAAGTCCTTCCCGCTGA-3'	5'-GAAACTGGCACCCTTGAAAA-3'
TNFα	5´ -TCCTCACAGAGCCAGCCCCC-3´	5´ -CTCCAGGACACCCCGGCCTT-3´
IL 1β	5′-TGAGTGACACTGCCTTCCTG-3′	5′-AGGCTTCCTTGTGCAAGTGT-3′
F4/80	5´ -CCAGCTTATGCCACCTGCA-3´	5´ -TCCAGGCCCTGGAACATTGG-3´
CD36	5´ -CTCTGACATTTGCAGGTCCA-3´	5´ -CACAGGCTTTCCTTCTTTGC-3´

***Tabla I*: Secuencias de los primers utilizados para las amplificaciones por PCR en tiempo real.** *CYP11A1: citocromo P450 scc; StAR: Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda; MC2R: receptor de melanocortina tipo 2; PPARγ: receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa; IL1β: interleuquina 1 beta; F4/80: proteína marcadora de macrófagos y CD36: translocasa de ácidos grasos.*

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización a 95ºC por 3 min, 40 ciclos de 20s a 95ºC y 20s a 52ºC, y finalmente 30s a 72ºC. La expresión relativa de los genes se analizó utilizando el método CT comparativo, y los niveles de los ARNm específicos fueron normalizados con la expresión de β-actina. Para el análisis de los datos se utilizó el programa Rotor Gene 6000 Series (version 1.7 Build 40).

Inmunotransferencia

Las muestras de proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS en condiciones desnaturalizantes. Para ello, se tomaron alícuotas correspondientes a 60 µg de proteínas y se agregó ¼ del volumen de muestra de TCA 100% manteniéndose a 4 ºC durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 15000 rpm a 4ºC, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con acetona fría. Se dejaron secar las muestras y se resuspendieron en 20 µl en SB 1X (Tris-HCL pH 6.5 50 mM, glicerol 10%, SDS 2% y azul de bromofenol) calentando 15 minutos a 65ºC. Se agregó DTT 0.1 M y se calentó a 95ºC durante 5 minutos. Las proteínas fueron

luego electrotransferidas a membranas de PVDF en un aparato Trans Blot SD (Biorad, Hercules, CA, USA) en buffer de transferencia (Tris HCl 25 mM pH 8.3; Glicina 192 mM y metanol 20%) a 0.28 mA durante 65 minutos. Las membranas fueron tratadas con solución de bloqueo (TBS-Tween 0,1% con 5% de leche descremada) durante una hora y luego fueron incubadas toda la noche a 4ºC con anticuerpos policlonales anti COX-2 (dilución 1:200), HO-1 (1:5000), iNOS (1:500) o actina (dilución 1:1000) .Todos los anticuerpos utilizados fueron policlonales obtenidos en conejo (COX-2 de Cayman Chemical Company, HO-1 Stressgen Biotechnologies, iNOS y actina de Santa Cruz Biotehnology, Inc). Las membranas se lavaron con TBS-Tween 0.1% (1lavado de 15 minutos y 2 de 5 minutos). Como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) obtenido en cabra (Bio-Rad) y el sistema de detección ECL (Amersham Life Science). Como control de la electrotransferencia se tiñeron las membranas de PVDF con Ponceau 0.2 % en TCA 3%

Determinación de la actividad enzimática de la Óxido Nítrico Sintasa (NOS)

Se determinó la actividad de NOS mediante el monitoreo de la conversión de L-[^{3}H]-arginina a L-[^{3}H]-citrulina, como se ha descripto anteriormente [43]. Se utilizaron alícuotas de los sobrenadantes del homogenato de las glándulas adrenales provenientes de los animales controles y tratados, obtenidos como se detalló previamente.

Brevemente, a 50 µl de muestra se le agregan 50 µl de una mezcla de reacción conteniendo HEPES 10 mM pH 7.4, L-arginina 20 µM, ditiotreitol 0.5 mM, NADPH 1mM, L-[^{3}H]-arginina 187 nM y cloruro de calcio 1.25 mM y se incubó por 15 minutos a 37 ºC. La reacción se frenó por el agregado de 300 µl de buffer stop frío (conteniendo EGTA 10 mM, EDTA 10 mM y HEPES 50 mM pH 5.0). Se agregó a cada tubo 800 µl de la resina de

intercambio catiónico para separar la L-[^{3}H]-arginina que no reaccionó, se agitó durante 5 minutos y se centrifugó 5 minutos a 1000 rpm tomándose 600 µl del sobrenadante para su cuantificación por espectrometría de centelleo líquido. La actividad de NOS se expresa como pmoles de L-[^{3}H]-citrulina formados por mg de proteína y por minuto.

Mediciones hormonales

La corticosterona fue extraída del suero con diclorometano y sus niveles fueron determinados por RIA como ha sido previamente descripto [128]. Los niveles séricos de insulina fueron evaluados utilizando un equipo comercial de enzima y ensayo ELISA (Alpco Diagnostics ™ Insulin (Rat) Ultrasensitive EIA, Salem, NH, USA).

Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad de la distribución de los datos utilizando el test de Kolmogorov- Smirnoff. Los datos se expresan como media ± SEM. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas con un test t o por ANOVA seguido del test de Tukey, cuando correspondía. Todos los cálculos fueron realizados utilizando el programa GraphPad InStat versión 3.06 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

DESARROLLO DE INSULINORRESISTENCIA EN ANIMALES ALIMENTADOS CON UNA DIETA RICA EN SACAROSA

En el primer grupo de experimentos se analizó la evolución en el tiempo de diversos parámetros bioquímicos y metabólicos en ratas alimentadas con una dieta rica en sacarosa (DRS).

Los animales mantenidos con la dieta suplementada presentaron un mayor consumo calórico durante todo el período de estudio (figura 9) y, partir de la séptima semana de tratamiento mostraron un mayor peso corporal que los animales del grupo control (figura 10).

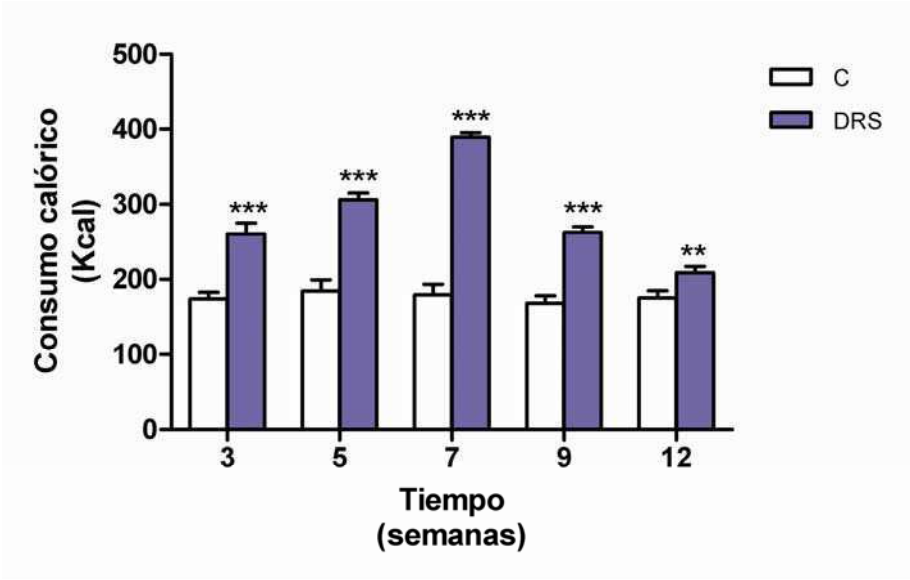


***Figura 9*: Consumo calórico.** *Se muestra el promedio de las kilocalorías consumidas por rata y por día a lo largo de las 12 semanas de tratamiento por animales controles (C) o que fueron alimentadas con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS). Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{**}p< 0.01$; $^{***}p< 0,001$ vs. C por el test t.*

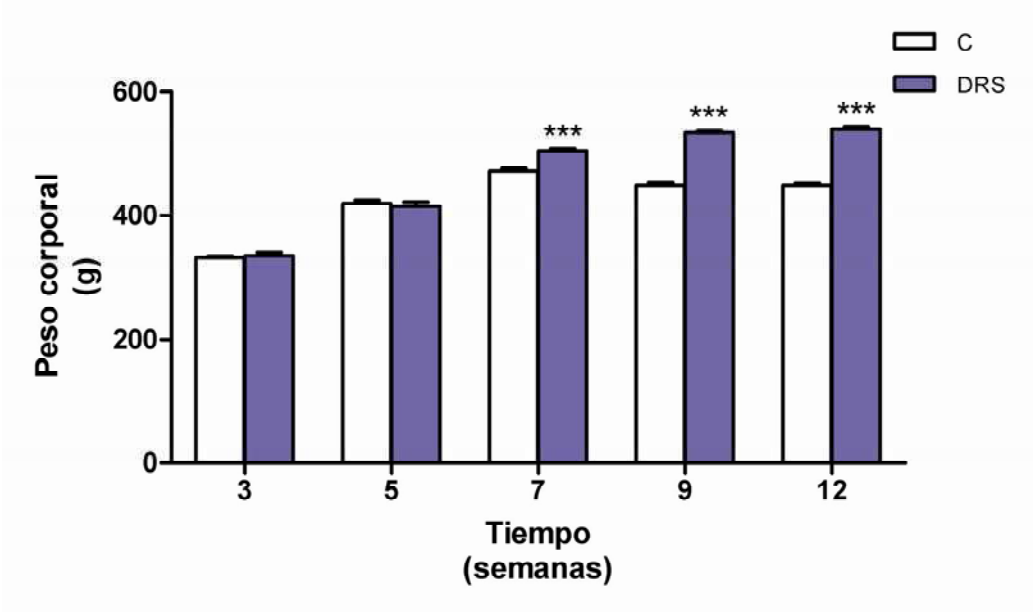
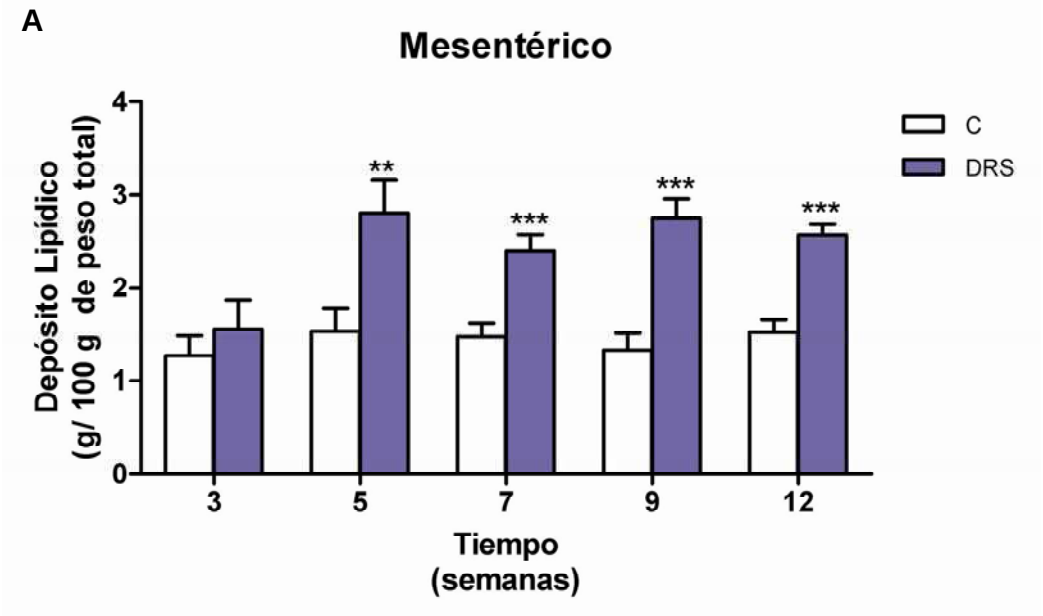


***Figura 10**: **Variación del peso corporal.** Se muestra la evolución del peso corporal promedio de los animales (g) en el grupo control (C) o en el que fue alimentado con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS) a lo largo de las 12 semanas de tratamiento. Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{***}p < 0,001$ vs. C por el test t.*

Al analizar el peso de los depósitos lipídicos, se observó que el grupo DRS presentaba un aumento en los depósitos de origen mesentérico, epididimal y retroperitoneal (figura 11 A, B y C) a partir de la 5ta semana de iniciado el tratamiento.



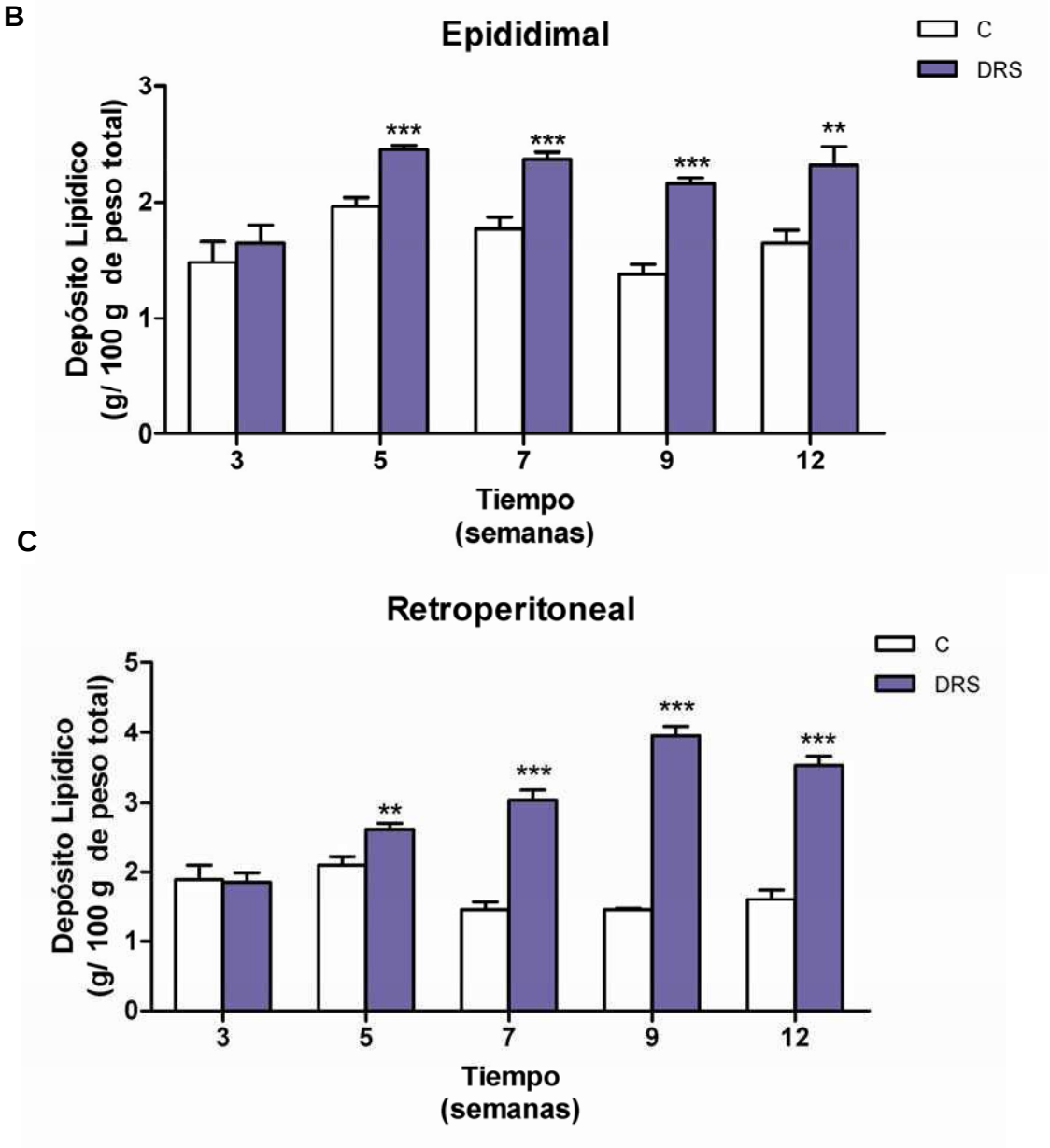
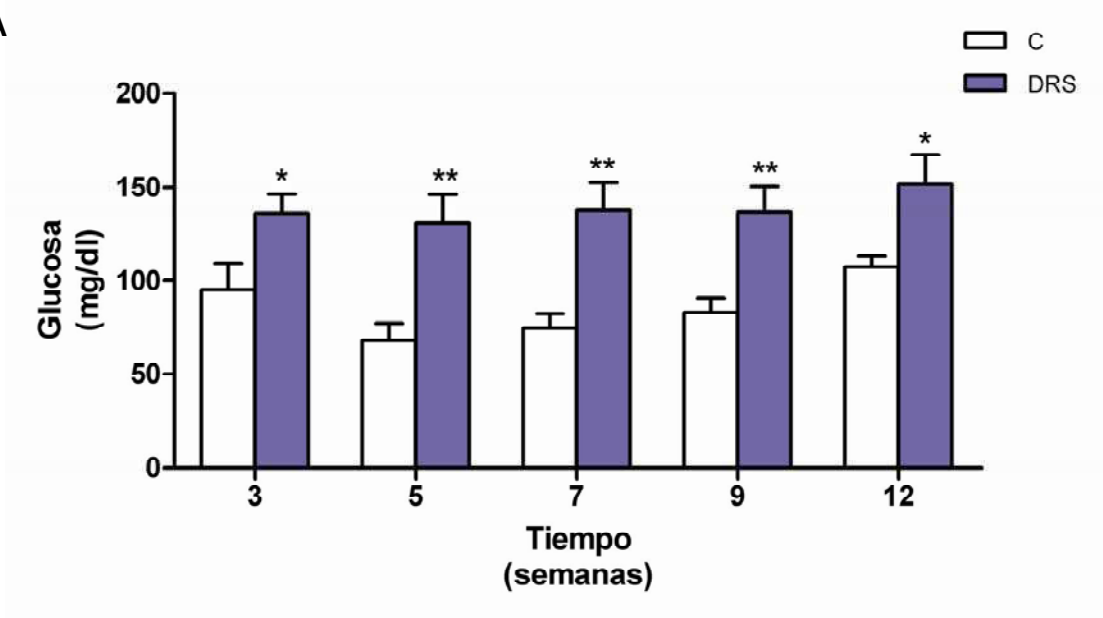


***Figura 11**: **Peso promedio de depósitos lipídicos.** Se indica la evolución del peso relativo promedio, en g/100g de peso corporal, de las grasas mesentérica (A), epididimal (B) y retroperitoneal (C) a lo largo de las 12 semanas de tratamiento en ratas controles (C) o que fueron alimentadas con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS). Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{**}p < 0,01$ y $^{***}p < 0,001$ vs. el grupo C < por el test t.*

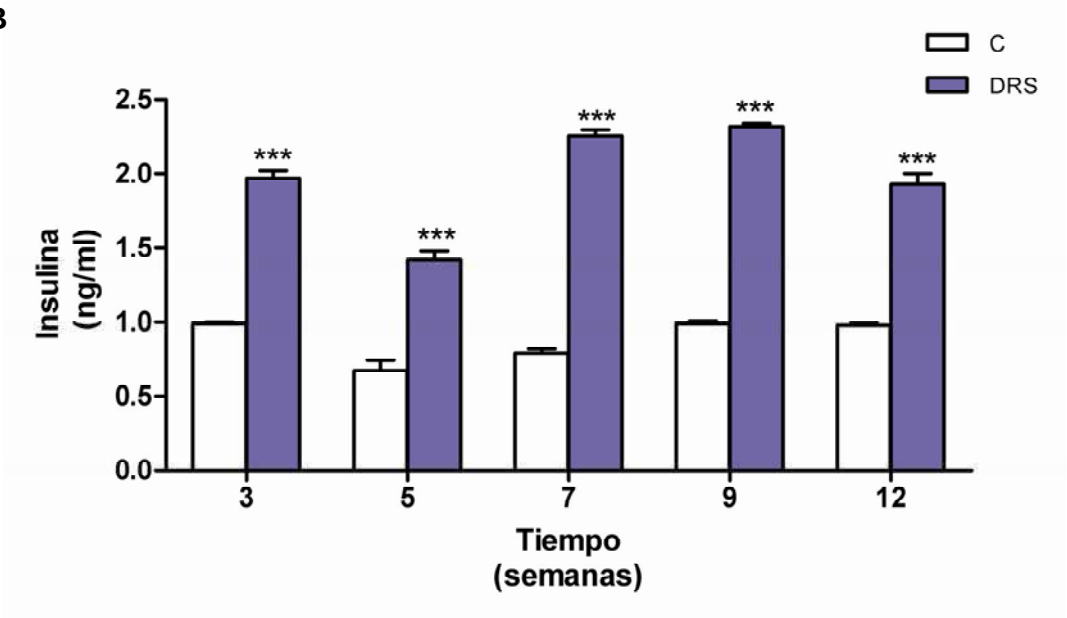
Con respecto al efecto de la dieta en parámetros bioquímicos sistémicos, nuestros resultados indicaron que los animales del grupo DRS

presentaron mayores niveles de glucosa, insulina y triglicéridos séricos que los animales controles a lo largo de todo el período evaluado (figura 12 A, B y C).

A



B



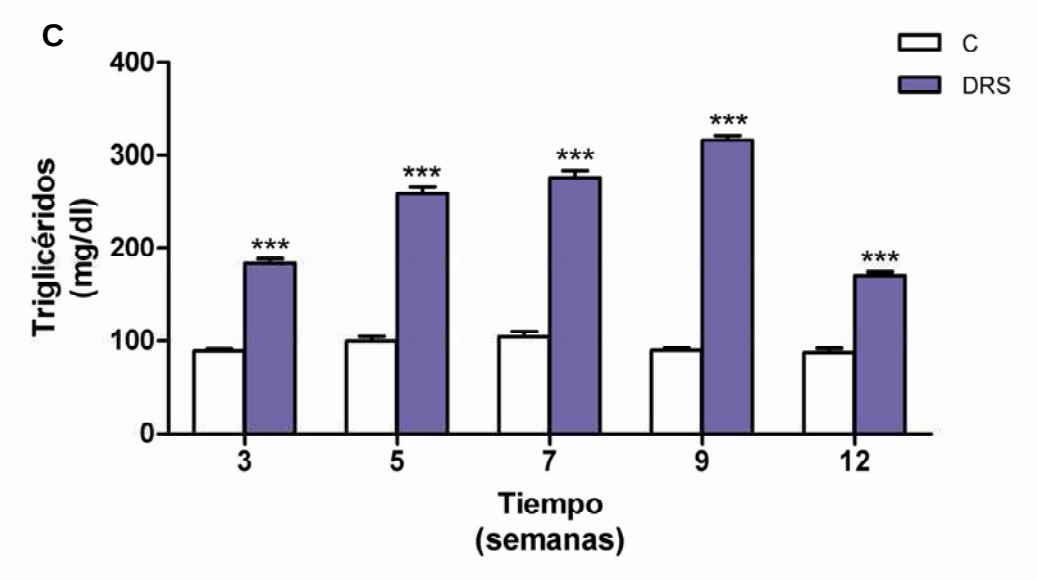


***Figura 12*: Niveles de glucosa, insulina y triglicéridos séricos:** *Se muestra la evolución de los niveles de glucosa (A), insulina (B) y triglicéridos (C) en el suero de ratas controles o alimentadas con sacarosa 30% en el agua de bebida, luego de 3, 5, 7, 9 y 12 semanas de tratamiento. Las muestras se tomaron luego de 4 horas de ayuno. Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{*}p< 0,05$, $^{**}p< 0,01$, $^{***}p< 0,001$ vs. el grupo control por el test t.*

Para estimar el establecimiento de un estado de insulinorresistencia se realizó un test de tolerancia a la insulina y se calculó el índice HOMA-IR en la séptima semana de tratamiento. En comparación con el grupo control, los animales del grupo DRS presentaron una menor respuesta a la insulina exógena, evidenciada por una menor pendiente de desaparición de glucosa del compartimiento sanguíneo (figura 13). El índice HOMA-IR calculado en el grupo DRS fue mayor que el de los controles (Control: 2.64 ± 0.3 y DRS: 11.23 ± 0.18, $^{***}p<0.001$ vs. el grupo control por el test t).

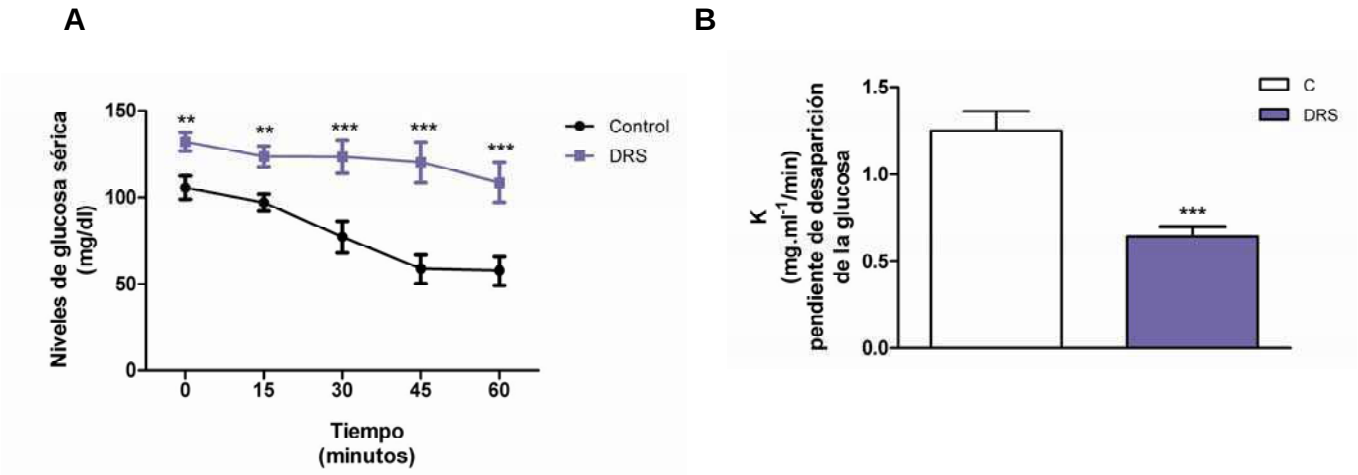


Figura 13: ***Test de tolerancia a la insulina.*** *Luego de siete semanas de tratamiento se administró 0,75 U/ml de insulina i.p. a los animales controles (C) o alimentados con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS) y se determinaron los niveles de glucosa séricos (A) en distintos intervalos. Se calculó la pendiente de desaparición de la glucosa (K) (B). Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{**}p<0.01$; $^{***}p<0,001$ vs. el grupo control por el test t.*

En la séptima semana de tratamiento, los niveles de colesterol HDL se encontraron disminuidos (figura 14 A) mientras que los de colesterol no-HDL fueron mayores que los de los correspondientes controles (figura 14B).

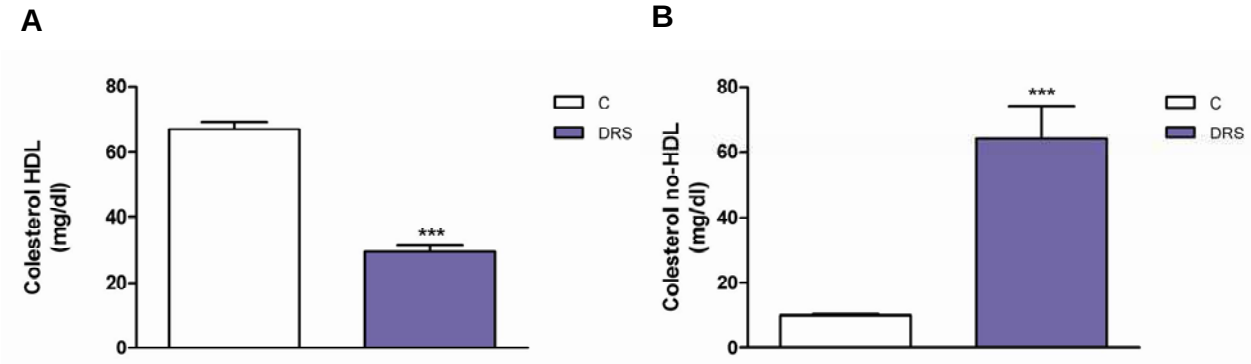


Figura 14: ***Colesterol HDL y colesterol no-HDL.*** *Se muestran los niveles séricos de colesterol HDL (A) y colesterol no-HDL (B) luego de un ayuno de 4 horas de animales controles (C) o que fueron alimentadas con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS) durante siete semanas. Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{***}p<0.001$ vs. el grupo control por el test t.*

ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y FUNCIONAL DE LA CORTEZA ADRENAL EN ANIMALES ALIMENTADOS CON UNA DIETA RICA EN SACAROSA

Una vez confirmado el establecimiento del estado de insulinorresistencia, luego de siete semanas de tratamiento, se analizó el efecto de la dieta sobre la morfología y la funcionalidad adrenal.

Los resultados indicaron que el grupo DRS presentó una disminución en el tamaño y el peso adrenal (figura 15 A y B).

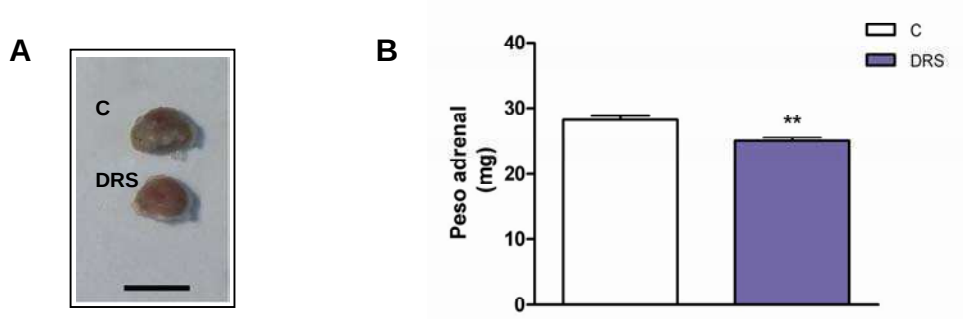


***Figura 15**: **Tamaño y peso de las glándulas adrenales.** Se muestra una fotografía de glándulas adrenales representativas de los grupos control (C) o de animales que fueron alimentados con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS) durante siete semanas (A) y el peso adrenal promedio en cada grupo (B). Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{**}p < 0.01$ vs. el grupo control por el test t. La barra negra corresponde a 5 mm.*

Para evaluar si los cambios descriptos a nivel adrenal se acompañaban de alteraciones en la morfología de la glándula se realizó una coloración topográfica (tricrómico de Masson) en cortes de tejido conteniendo la *zona fasciculata* de la corteza adrenal de animales de los grupos control y DRS. Como se evidencia en la figura 16, los animales que recibieron la dieta rica en sacarosa mostraron una alteración en el arreglo trabecular de la *zona fasciculata* (figura 16 A y B) y un aumento en el número y el tamaño de los espacios dejados por los lípidos intraadrenales producto del procesamiento para la inclusión en parafina (figura 16 C y D *ver flechas negras*).

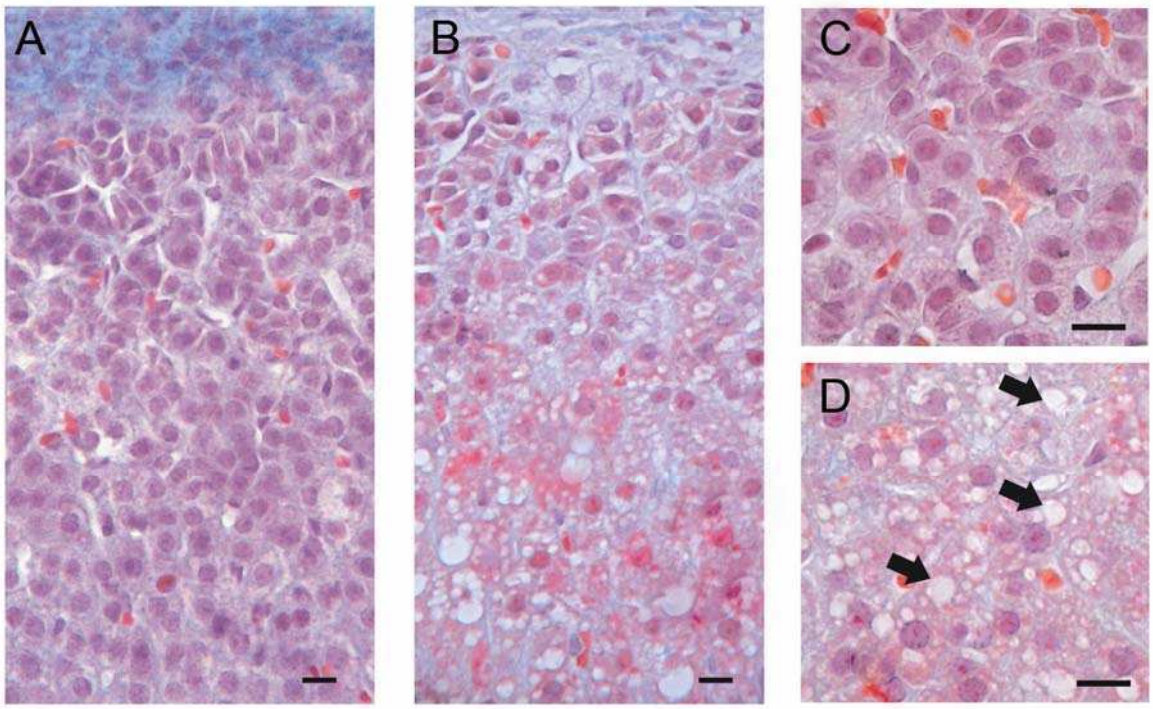
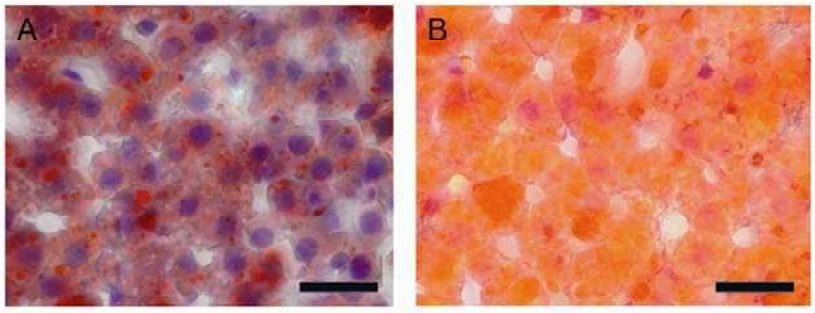


***Figura 16**: **Tricrómico de Masson de cortes de glándula adrenal.** Se colorearon cortes de 5 µm de adrenales de ratas controles (A y C) o que fueron alimentadas con sacarosa 30% (B y D) en el agua de bebida durante siete semanas. En los paneles A y B la barra negra representa 10 µm y en los paneles C y D es igual a 5 µm. Las flechas negras (D) muestran los espacios dejados por los depósitos lipídicos.*

La presencia de lípidos intraadrenales se evaluó mediante la coloración de Sudan III de cortes de tejido incluidos en OCT. Estos cortes mostraron un marcado aumento en la cantidad de lípidos neutros en los animales del grupo DRS respecto de los correspondientes controles (figura 17 A, B y C).



C

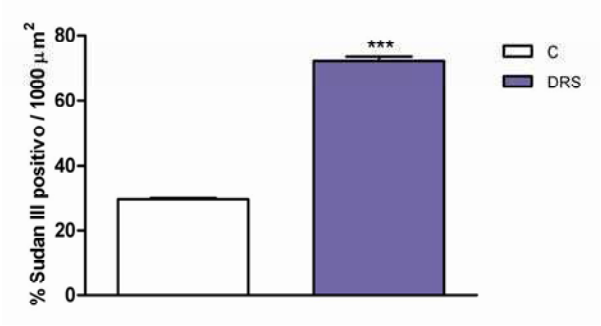


***Figura 17**: **Tinción de lípidos en la corteza adrenal.** Se colorearon cortes de 5 µm de glándulas adrenales obtenidas de ratas controles (A) o que fueron alimentadas con sacarosa 30% en el agua de bebida (B) durante siete semanas. En los paneles A y B la barra negra es igual a 5 µm. En (C) se muestra la cuantificación del porcentaje de coloración Sudan III positivo por cada 1000 µm². Se indica la media ± SEM para n= 6. ***p< 0.001 vs. el grupo control por el test t.*

Para evaluar la naturaleza de esos depósitos lipídicos intraadrenales, se determinaron los niveles de triglicéridos y colesterol tisulares. Se observó que el grupo DRS presentaba mayores niveles de triglicéridos adrenales mientras que los valores de colesterol no mostraron diferencias entre el grupo alimentado con sacarosa y el grupo control (figura 18 A y B).

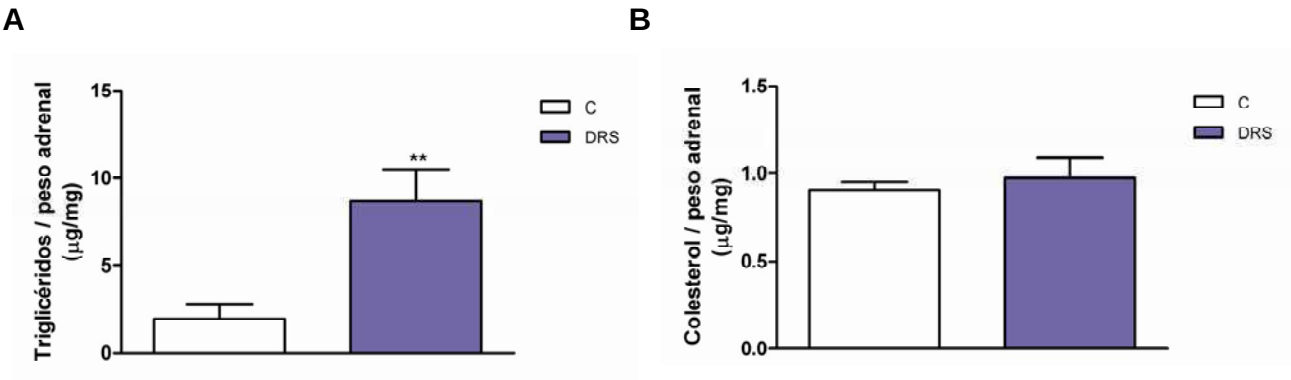


Figura 18: ***Niveles de triglicéridos y colesterol en la corteza adrenal.*** *Los niveles de triglicéridos (A) y de colesterol (B) en el tejido fueron determinados en homogenatos de adrenales de ratas controles (C) o alimentadas con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS). Se indica la media ± SEM para n= 6.* $^{**}p < 0,01$ *vs. control por el test t .*

La activación de PPAR-γ participa en la regulación de numerosas vías metabólicas mediante la modificación de la expresión de diversos genes. Entre ellos, los involucrados en la lipogénesis como el del transportador de ácidos grasos CD36. El análisis de los niveles de expresión de PPAR-γ y de CD36 en animales controles y del grupo DRS mostró un incremento significativo en los animales del grupo DRS (figura 19).

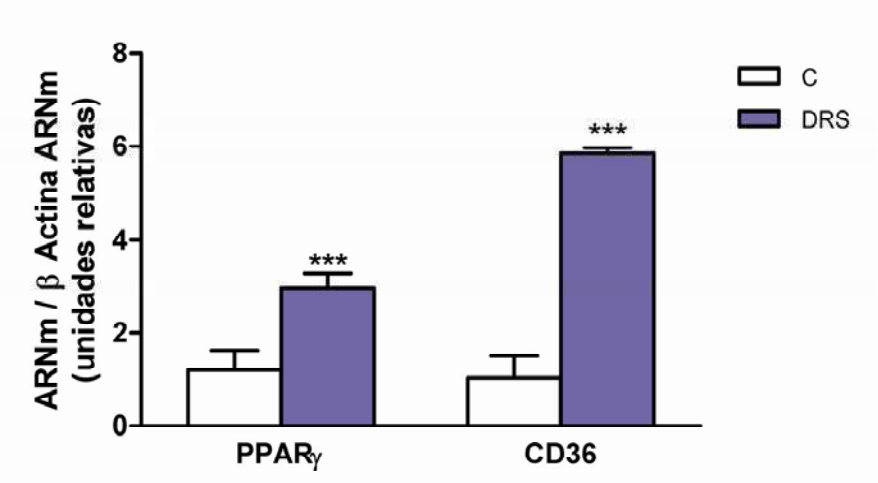
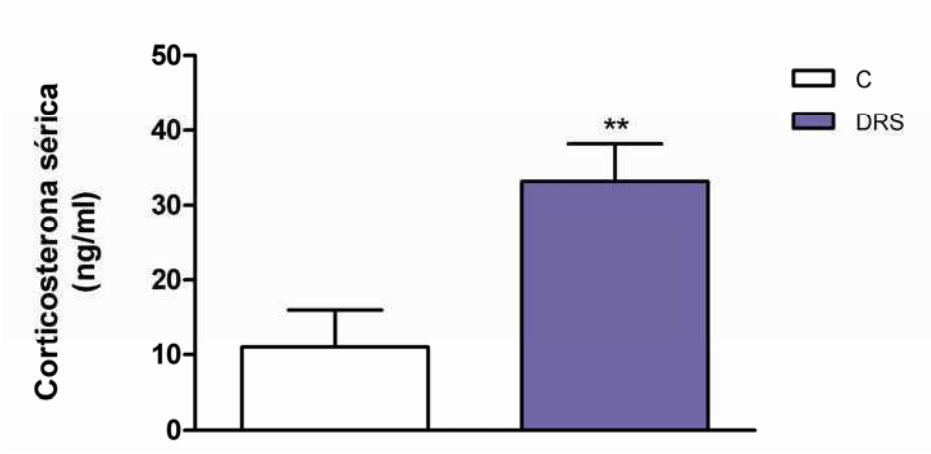


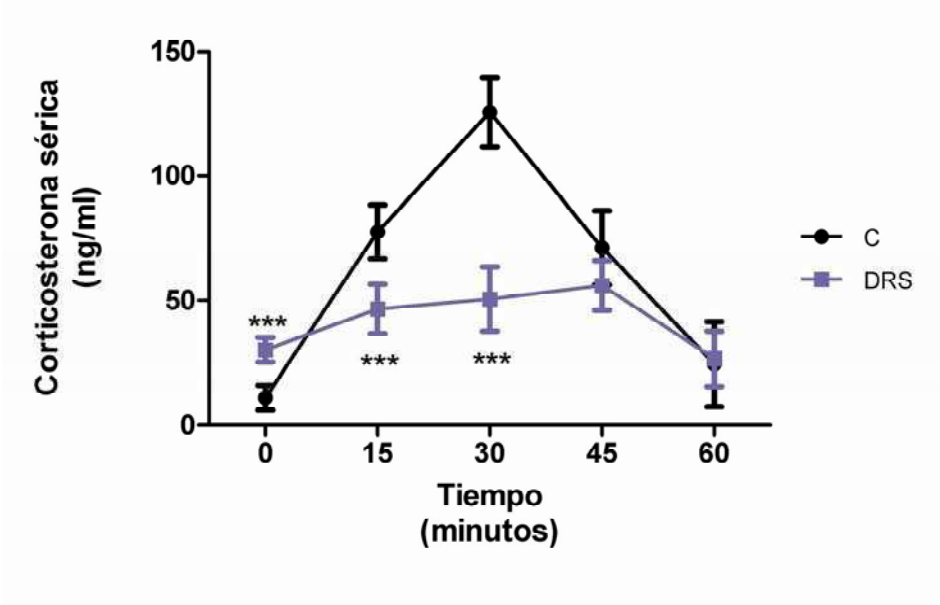
Figura 19: ***Expresión de PPAR-γ y CD36 en corteza adrenal.*** *Se determinaron los niveles de ARNm de PPAR-γ, CD36 y β-actina por RT-PCR en tiempo real, en la corteza adrenal de ratas controles (C) y de ratas alimentadas con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS). Se indica la media ± SEM para n= 6.* $^{***}p < 0,001$ *vs. el grupo control por el test t .*

Se estudió a continuación, si las alteraciones observadas a nivel morfológico correlacionaban con cambios en la funcionalidad adrenal. Para ello se determinó la corticosteronemia basal y se realizó una prueba de estimulación aguda de los animales con un pulso de ACTH exógeno. Como puede observarse en la siguiente figura, los animales alimentados con DRS mostraron un aumento en los niveles séricos basales de corticosterona (medidos en horas de la mañana) y una disminución en la respuesta al estimulo con la hormona, respecto del grupo control (figura 20 A, B y C).

A



B



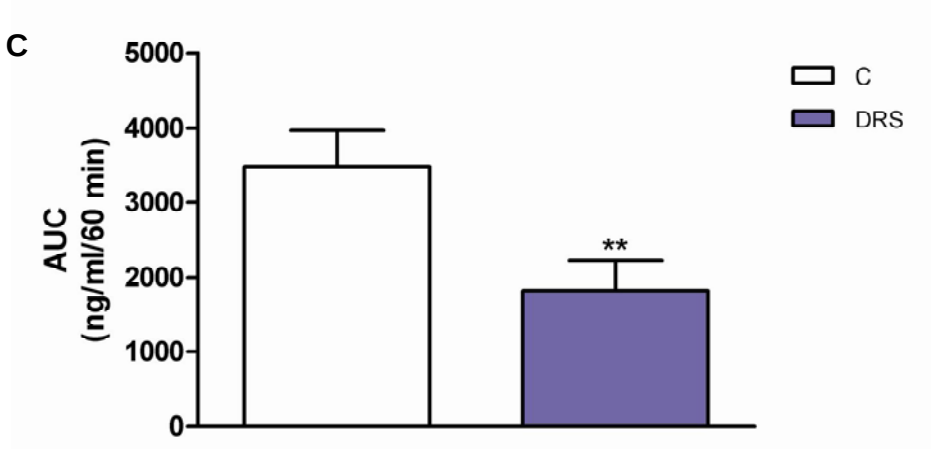


Figura 20: ***Corticosteronemia basal y prueba de estimulación aguda con ACTH.*** *Se indican los niveles de corticosterona sérica basales (A) y luego de la administración de una dosis de 4 UI/kg de ACTH i.p. (ensayo de estimulación aguda) (B). La corticosteronemia se determinó por RIA en el suero de ratas controles y de ratas alimentadas con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS). En (C) se observa el área bajo la curva del ensayo de estimulación aguda con ACTH. Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ vs. el grupo control por el test t.*

Se determinaron a continuación, por transcripción reversa y PCR en tiempo real, los niveles de ARNm de StAR y CYP11A1 (P450 scc), proteínas clave en la regulación de la esteroidogénesis adrenal. Los resultados de estos experimentos indicaron un aumento en los niveles de ARNm tanto de StAR como de CYP11A1 así como de los niveles proteicos de StAR en el grupo DRS (figura 21).

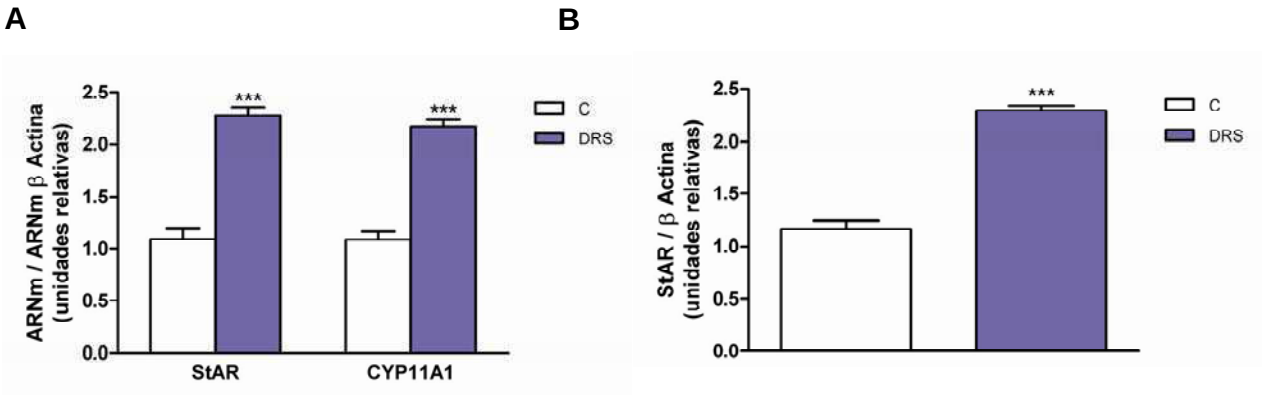


***Figura 21*: Efecto de la modificación dietaria sobre los niveles de expresión de StAR y CYP11A1 en la corteza adrenal.** *Los niveles de ARNm de StAR y CYP11A1 fueron determinados por RT-PCR de tiempo real (A). Los niveles proteicos de StAR y β-actina (B) fueron determinados por inmunoblot en homogenatos de adrenal de ratas controles o alimentadas con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS). En B) se muestra la cuantificación de 3 experimentos independientes. Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{***}p < 0,001$ vs. el grupo control por el test t .*

El descenso del peso adrenal y la disminución en la sensibilidad a la estimulación aguda con ACTH podrían ser consecuencia de una alteración en los niveles de expresión del receptor de ACTH (MC2R) en la corteza adrenal. El análisis de los niveles de expresión del MC2R por RT-PCR de tiempo real mostró una disminución en los niveles de expresión de MC2R en el grupo DRS comparado con el grupo control (figura 22).

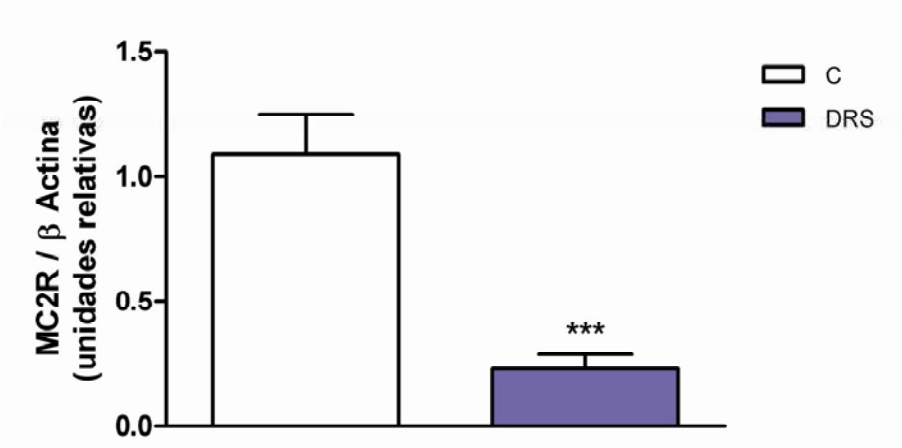
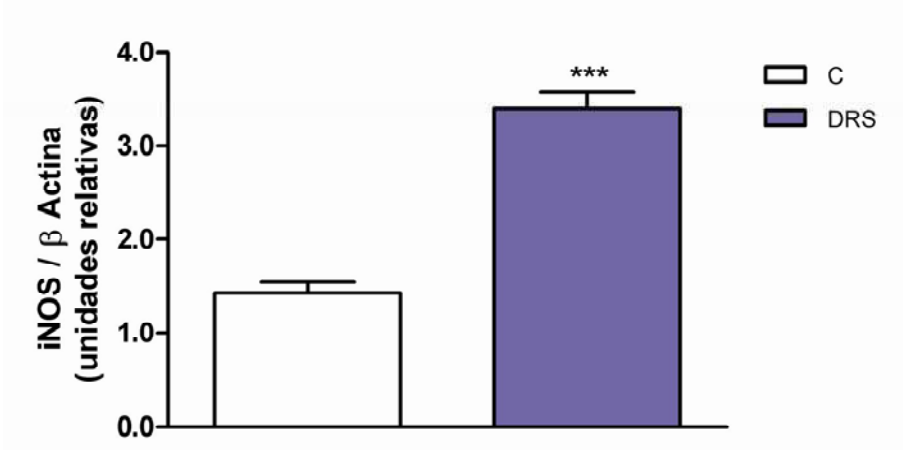


Figura 22: ***Efecto de la modificación dietaria sobre los niveles de expresión del receptor de ACTH (MC2R) en corteza adrenal.*** *Se determinaron los niveles de ARNm de MC2R y β-actina en ARN total obtenido de la corteza adrenal de ratas controles (C) o alimentadas con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS) por RT- PCR de tiempo real. Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{***}p< 0.001$ vs. el grupo control por el test t .*

Dado que la IR impacta sobre la corteza adrenal asociándose con cambios morfológicos y funcionales, se evaluó el efecto de la misma sobre los sistemas moduladores autócrinos y/ o parácrinos de la esteroidogénesis adrenal. Como mencionamos previamente, uno de los sistemas moduladores locales de la esteroidogénesis es el sistema de la óxido nítrico sintasa (NOS). Para analizar su rol en este modelo se evaluaron los niveles de expresión de la isoforma inducible de la NOS (iNOS) y la actividad de NOS total en homogenatos de adrenal en animales de los grupos DRS y control. La figura 23 muestra que la dieta rica en sacarosa produce un aumento en la expresión de la isoforma inducible de NOS así como de la actividad total de la NOS en la corteza adrenal.

A



B

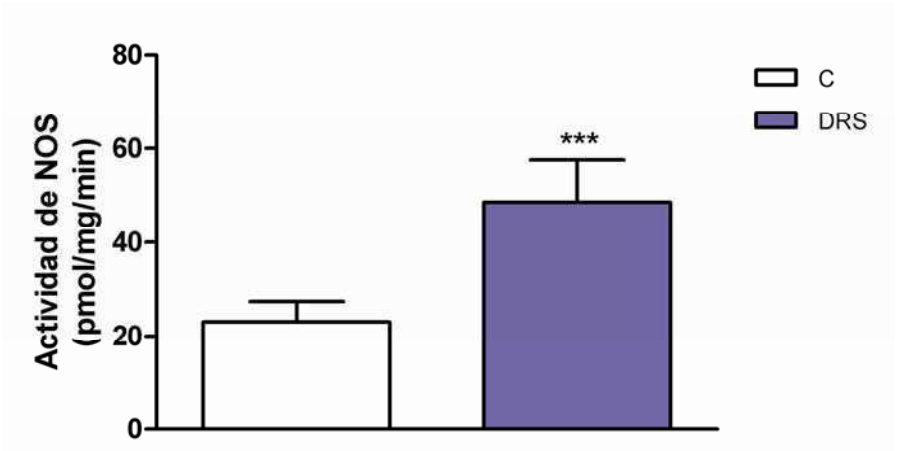


Figura 23: ***Niveles de expresión de las isoformas de la NOS y actividad de NOS en corteza adrenal.*** *(A) Se determinaron los niveles proteicos de iNOS y β actina, por inmunoblot, en homogenatos de adrenal de ratas controles (C) y ratas alimentadas con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS). En (B) se indica la actividad de NOS determinada según se describe en la sección de Materiales y Métodos. Se indica la media ± SEM para n= 6. ***p< 0.001 vs. el grupo control por el test t.*

Por otra parte, mediadores inflamatorios como las prostaglandinas también son moduladores locales de la esteroidogénesis. Se evaluó entonces la expresión de la isoforma inducible de la ciclooxigenasa (COX-2) en la corteza adrenal. Como se observa en la figura 24, los animales tratados con la dieta rica en sacarosa presentaron un aumento en la expresión de COX-2 respecto del grupo control.

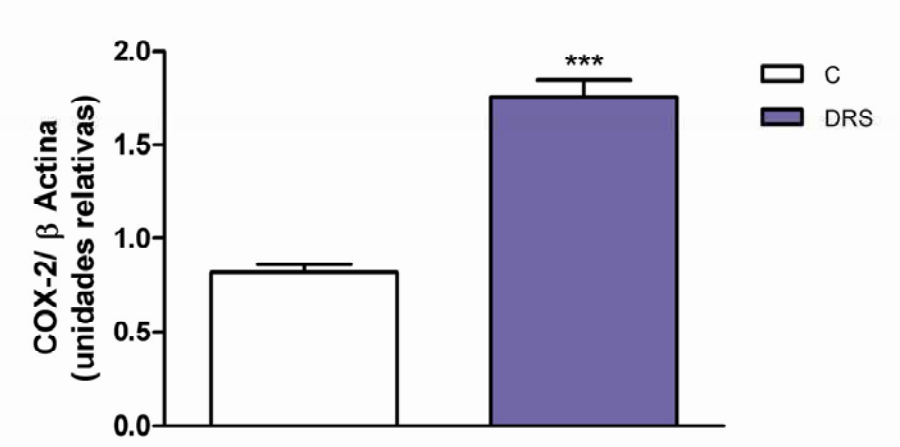


Figura 24: ***Niveles de expresión de COX-2 en corteza adrenal.*** *Los niveles proteicos de COX-2 y de β actina fueron determinados por inmunoblot, en homogenatos de adrenal de ratas controles (C) y de ratas alimentadas con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS). Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{***}p< 0.001$ vs. el grupo control por el test t.*

Adicionalmente a las funciones antioxidantes atribuidas a la actividad de hemooxigenasa, se ha demostrado que también funciona como modulador local de la esteroidogénesis. La figura 25 muestra que los animales del grupo DRS presentaron mayores niveles proteicos de HO-1 adrenal respecto al grupo control.

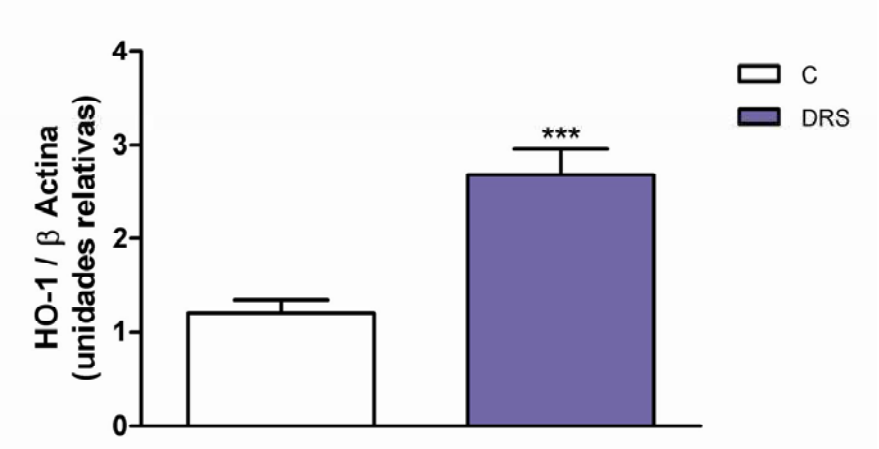


Figura 25: ***Expresión de HO-1 en corteza adrenal.*** *Se determinaron los niveles proteicos de HO-1 y de β-actina, por inmunoblot, en homogenatos de adrenal de ratas controles (C) o alimentadas con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS). Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{***}p< 0.001$ vs. el grupo control por el test t.*

Las citoquinas han sido postuladas como moduladores autócrinos y /o parácrinos positivos de la esteroidogénesis. En particular, IL-1β y TNF-α han demostrado ser capaces de inducir un aumento en la síntesis y secreción de glucocorticoides en células de la corteza adrenal tanto de humanos como de roedores [40, 41]. En nuestro modelo se observó un incremento en los niveles de expresión en la corteza adrenal de IL-1ß, TNF-α y del marcador de macrófagos F4/80 por RT-PCR en tiempo real (figura 26).

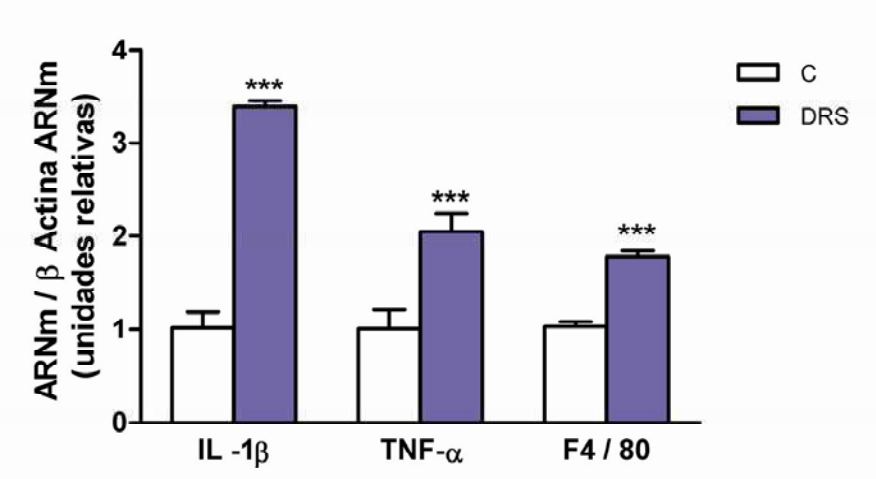


Figura 26: ***Expresión de IL1-ß, TNF-α y F4-80 en corteza adrenal.*** *Se muestran los niveles de ARNm de IL-1ß, TNF-α y F4/80 normalizados con β-actina en corteza adrenal de ratas controles (C) y de ratas alimentadas con sacarosa 30% en el agua de bebida (DRS) según fueron determinados por RT-PCR de tiempo real. Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{***}p<0,001$ vs. el grupo control por el test t.*

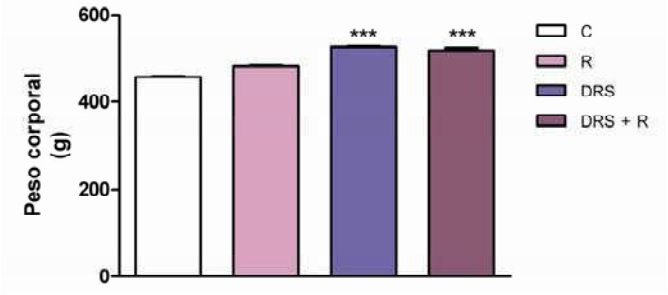
EFECTOS DE LA ROSIGLITAZONA SOBRE EL DESARROLLO DE INSULINORRESISTENCIA Y LOS CAMBIOS OBSERVADOS A NIVEL ADRENAL EN ANIMALES ALIMENTADOS CON UNA DIETA RICA EN SACAROSA

Las tiazolidinedionas (TZD) actúan como agonistas de la vía PPARγ, y se han utilizado ampliamente como fármacos insulino-sensiblizadores tanto en pacientes con IR o diabetes tipo 2, como en modelos animales de IR.

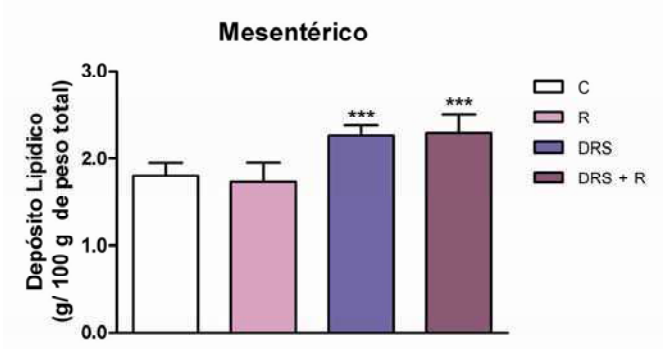
Los siguientes experimentos se diseñaron con el fin de analizar el efecto del tratamiento con rosiglitazona (RSG) en animales del grupo control o DRS sobre la insulinorresistencia y sobre la morfología y funcionalidad adrenal. Se evaluó el efecto sobre el peso corporal y los depósitos lipídicos en estos animales luego de 7 semanas de co-tratamiento.

Como se observa en la figura 27, la administración de rosiglitazona no evitó el aumento de peso corporal ni de los depósitos lipídicos en los animales del grupo DRS.

A



B



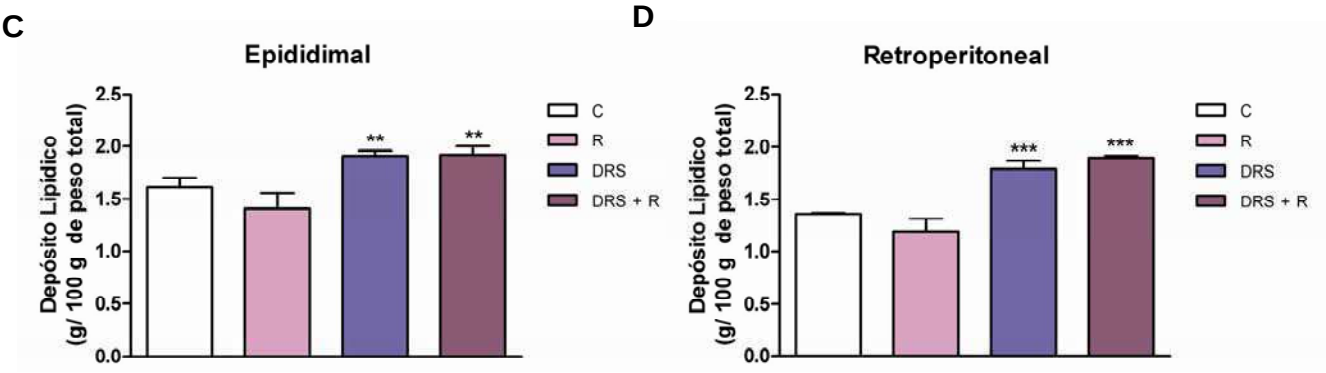
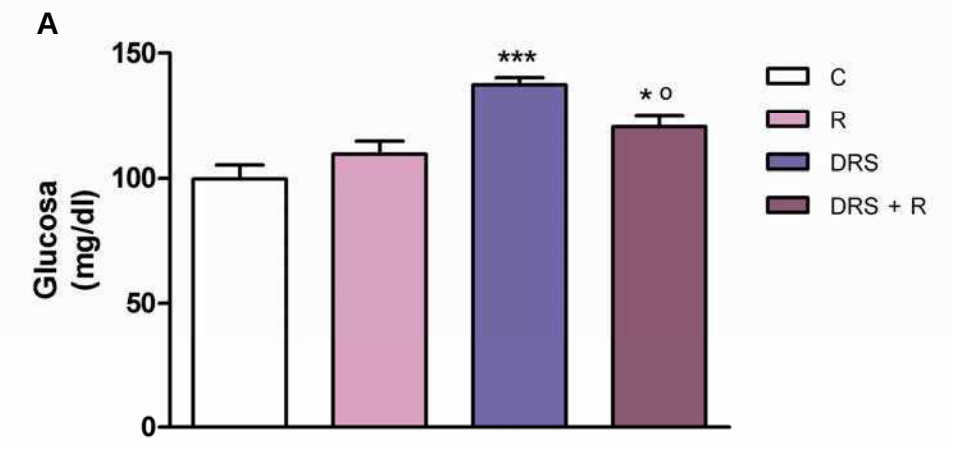


***Figura 27**: **Peso corporal y de los depósitos lipídicos.** Se muestra el peso corporal (A) y peso relativo promedio de los depósitos lipídicos, en g/100g de peso corporal, mesentérico (B), epididimal (C) y retroperitoneal (D) en animales de los siguientes grupos: controles (C), tratados con rosiglitazona 4 mg/kg vía oral (R), tratados con DRS (DRS) según se indicó en materiales y métodos y alimentados con DRS y tratados con rosiglitazona (DRS + R). Se indica la media ± SEM para n= 6, $^{**}p< 0.01$; $^{***}p< 0.01$ vs. el grupo control por el test de Tukey.*

Evaluamos a continuación el efecto de la rosiglitazona sobre diversos parámetros metabólicos. Como era de esperar, los resultados indicaron que el tratamiento con rosiglitazona disminuyó significativamente los niveles séricos de glucosa, insulina y triglicéridos en los animales sometidos al tratamiento farmacológico con respecto a los del grupo DRS (figura 28).



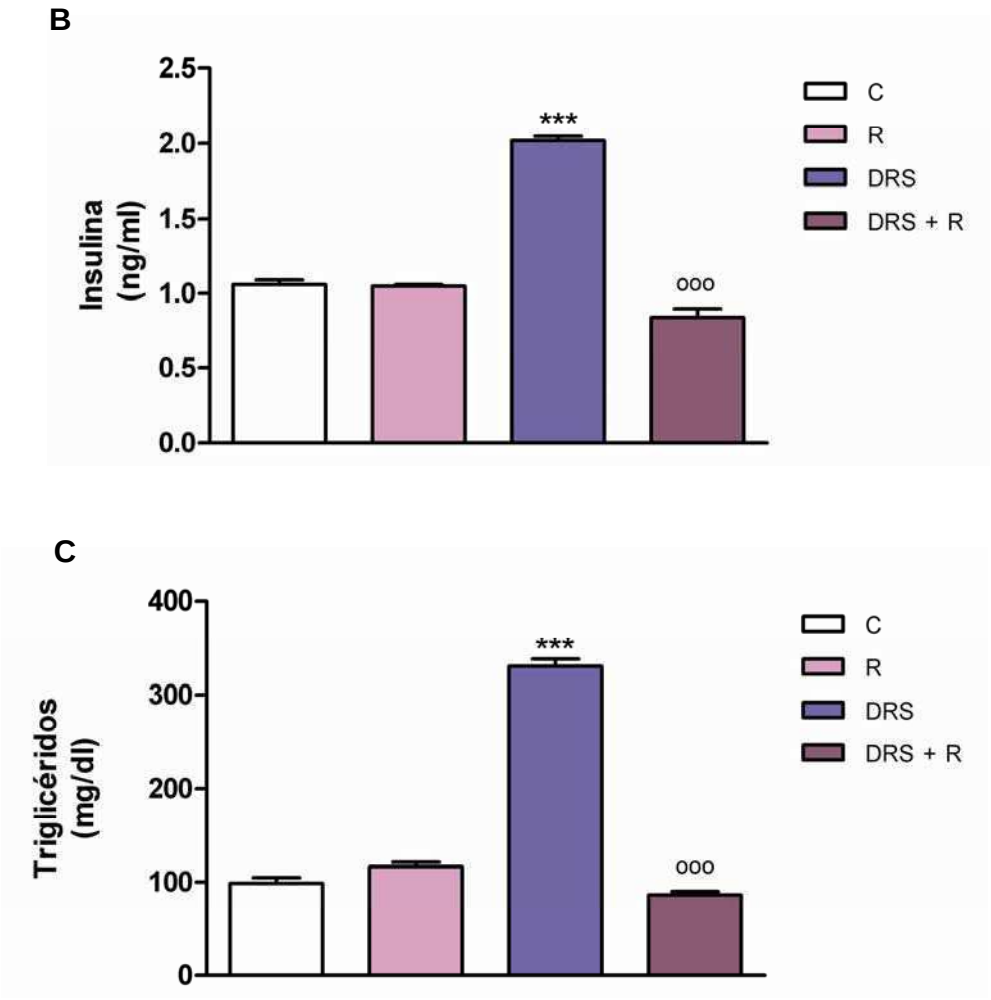


Figura 28: ***Glucemia, insulinemia y trigliceridemia.*** *Se determinaron los niveles de glucosa (A), insulina (B) y triglicéridos (C) en el suero de animales controles (C), tratados con rosiglitazona 4 mg/kg (R), que recibían la dieta suplementada con sacarosa (DRS) y que recibían simultáneamente la dieta y la rosiglitazona (DRS + R). Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{*}p< 0.05$; $^{***}p< 0.001$ vs. el grupo control y $^{o}p<0.05$; $^{ooo}p<0.001$ vs. DRS, por el test de Tukey.*

El tratamiento con rosiglitazona corrigió la respuesta de los animales del grupo DRS en la prueba de tolerancia a la insulina. Los resultados mostrados en la figura 29 indican que grupo DRS + R mostró una sensibilidad a la insulina similar a la del grupo control.

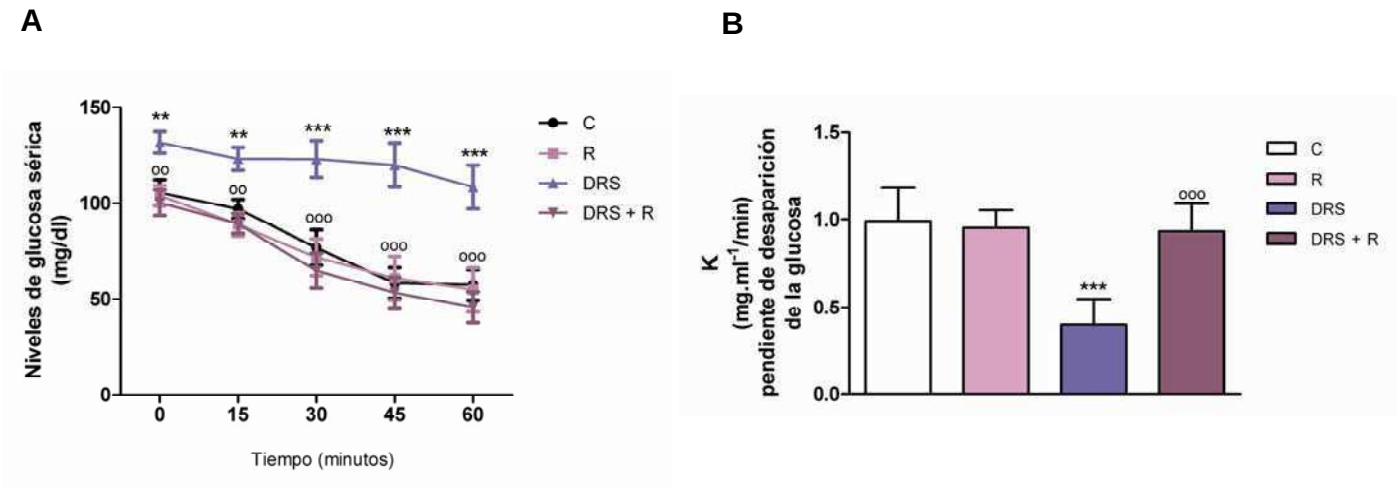


Figura 29: ***Test de tolerancia a la insulina.*** *Se realizó en los mismos grupos de animales (C, R, DRS y DRS + R) según se describe en Materiales y Métodos. En todos los grupos se determinó la glucemia en muestras obtenidas luego de 15, 30, 45 y 60 minutos de la inyección de insulina (0.75 UI/ml) (A). En (B) se muestra la pendiente de desaparición de glucosa del suero. Se indica la media ± SEM para n= 6.* $^{***}p<0.001$, $^{**}p<0.01$ *vs. el grupo control y,* $^{ooo}p<0.001$, $^{oo}p<0.01$ *vs. el grupo DRS, por el test de Tukey.*

Estos resultados indican que el co-tratamiento con rosiglitazona es capaz de evitar el establecimiento de un estado de insulinorresistencia sin modificar ni el peso corporal total ni el de los depósitos lipídicos.

Analizamos a continuación los efectos de la rosiglitazona sobre las alteraciones funcionales y morfológicas a nivel adrenal, previamente observadas en el grupo DRS.

Se examinó el peso y la morfología de las glándulas adrenales en los animales de los grupos no tratados (C y DRS) y tratados con rosiglitazona (R y DRS + R). La figura 30 muestra que el tratamiento con R previno el efecto de la dieta sobre el peso de las glándulas adrenales.

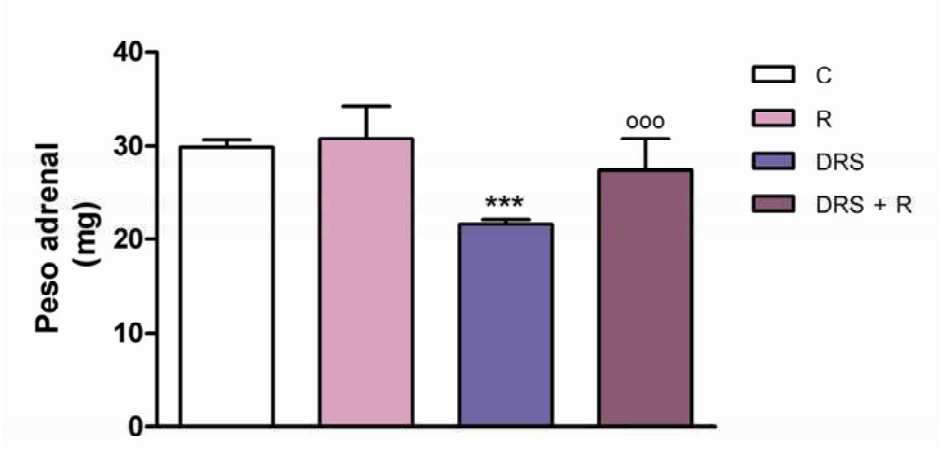


Figura 30: ***Peso de las glándulas adrenales.*** *Se determinó en animales de los grupos C, R, DRS y DRS + R, ya descriptos en Materiales y Métodos. Se indica la media ± SEM para n= 6.* $^{***}p< 0,001$ *vs. el grupo control,* $^{ooo}p<0,001$ *vs. DRS, por el test de Tukey.*

Por otro lado analizamos el efecto de la rosiglitazona sobre las alteraciones morfológicas de la corteza adrenal, para lo cual realizamos la coloración topográfica de tricrómico de Masson. Como se observa en la figura 31, el grupo co-tratado con dieta y rosiglitazona conservó el arreglo trabecular y la morfología característica de la *zona fasciculata* de la corteza adrenal de los animales controles (figura 31 A-D). Asimismo se observó una disminución en el número y el tamaño de espacios dejados por los acúmulos lipídicos (figura 31 E-H).

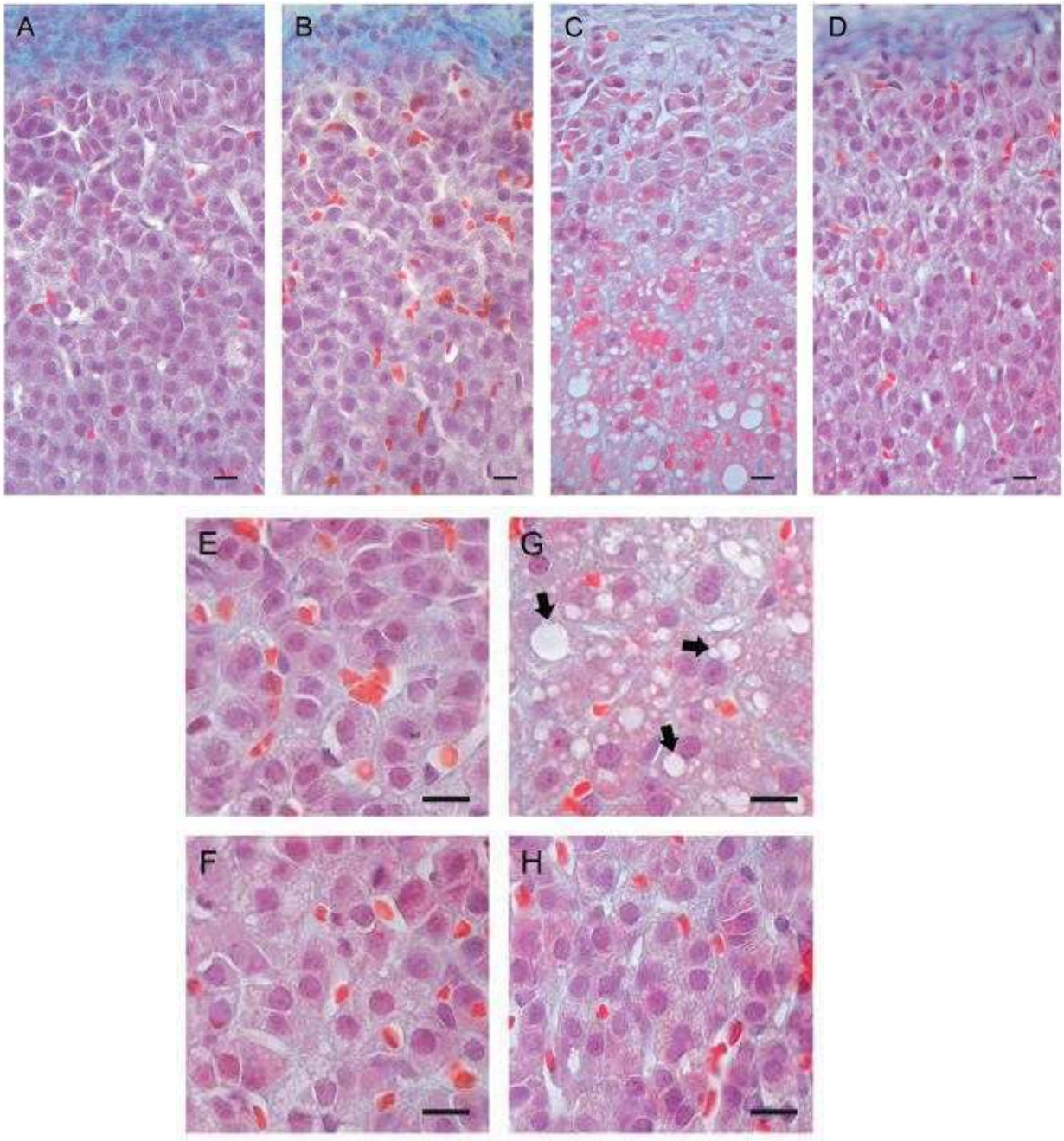


***Figura 31**: **Tinción con tricrómico de Masson de cortes de glándula adrenal.** Se colorearon cortes de 5 µm obtenidos de glándulas adrenales de animales controles (A y E), tratados con rosiglitazona 4 mg/kg (B y F), con la dieta (C y G) y con ambos tratamientos (D y H). En los paneles A-D la barra negra es igual a 10 µm y en los paneles E y H es igual a 5 µm. Las flechas negras (D) muestran los espacios dejados por los depósitos lipídicos.*

Para evaluar el efecto de la rosiglitazona sobre la acumulación lipídica intraadrenal se realizó una coloración de Sudan III de la *zona fasciculata* y se midieron los niveles de triglicéridos y colesterol tisulares en todos los grupos en estudio. Como se observa en la figura 32, el co-tratamiento con rosiglitazona previno la acumulación de lípidos así como el incremento del contenido de triglicéridos sin modificar el contenido de colesterol adrenal observado en los animales del grupo DRS.

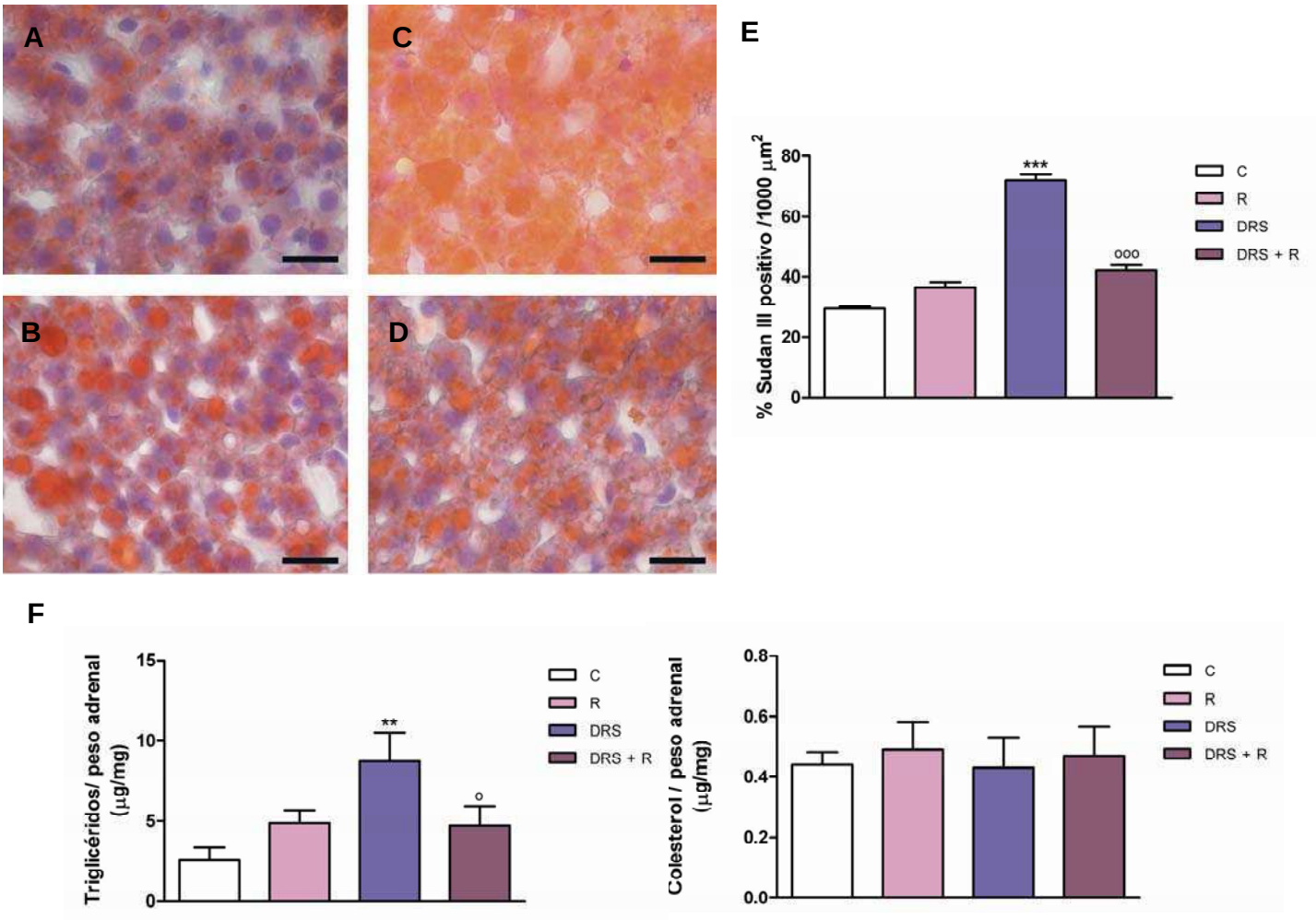


***Figura 32**: **Acumulación lipídica en la corteza adrenal.** (A) Se indica la coloración con Sudan III, de cortes de 5 µm de adrenales de animales controles (panel A), tratados con rosiglitazona 4 mg/kg (panel B), alimentados con DRS (panel C) y co-tratados con DRS y rosiglitazona (panel D). En los paneles A-D la barra negra es igual a 5 µm. En (E) se muestra el porcentaje de Sudan III positivo por cada 1000 µm² de área. En (F) se muestran los niveles de triglicéridos y colesterol determinados*

en homogenatos de corteza adrenal de los mismos grupos de animales que en A). Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{***}p< 0.001$, $^{**}p< 0.01$ vs. el grupo control y $^{ooo}p<0.001$, $^{o}p<0.05$ vs. el grupo DRS, por el test de Tukey.

Dado que la rosiglitazona es un agonista PPARγ, analizamos el efecto del co-tratamiento sobre los niveles de ARNm de PPARγ sobre uno de sus genes blanco, CD36. Como muestra la figura 33, el tratamiento con rosiglitazona previno el aumento en los niveles de expresión de PPARγ y disminuyó los de niveles de CD36 en la corteza adrenal de los animales alimentados con DRS.

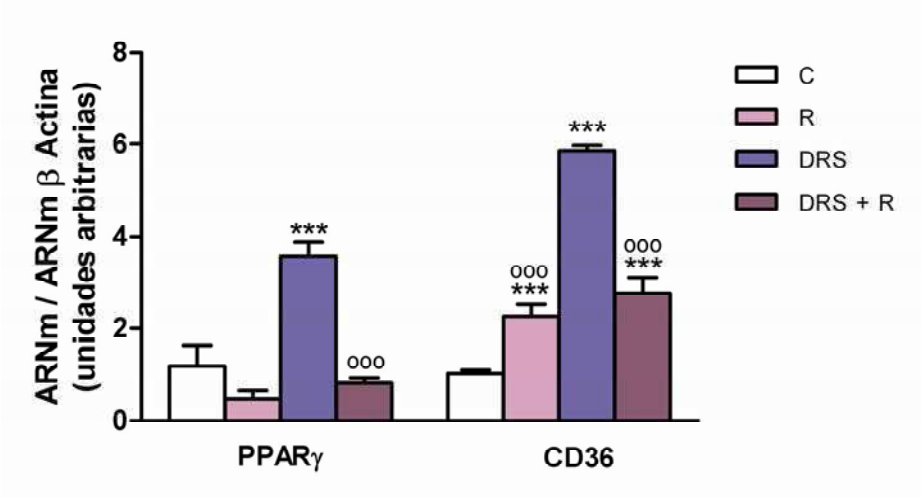
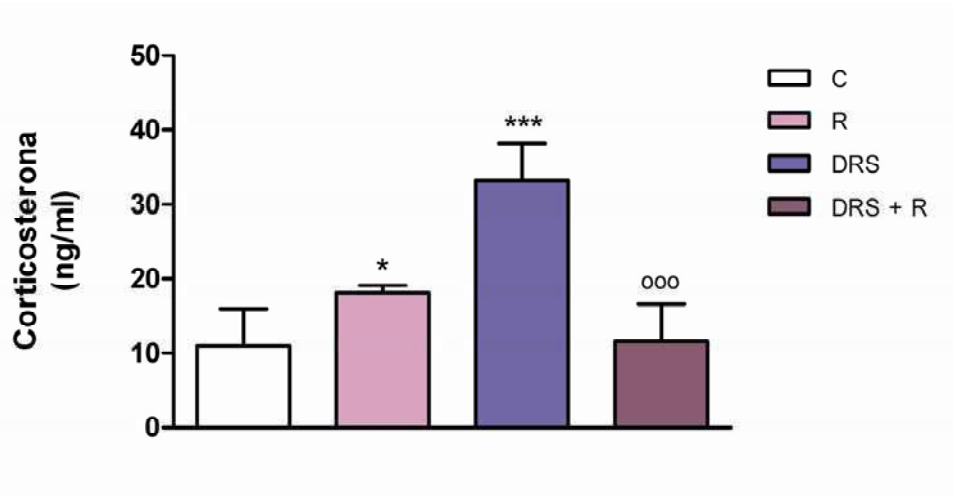


Figura 33: ***Efecto de la rosiglitazona sobre la expresión de PPAR-γ y CD36 en corteza adrenal.*** *Los niveles de ARNm de PPAR-γ y CD36 fueron determinados como se describe en la leyenda de la figura 30. Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{***}p<0.001$ vs. el grupo control y $^{ooo}p<0.001$ vs. el grupo DRS, por el test de Tukey.*

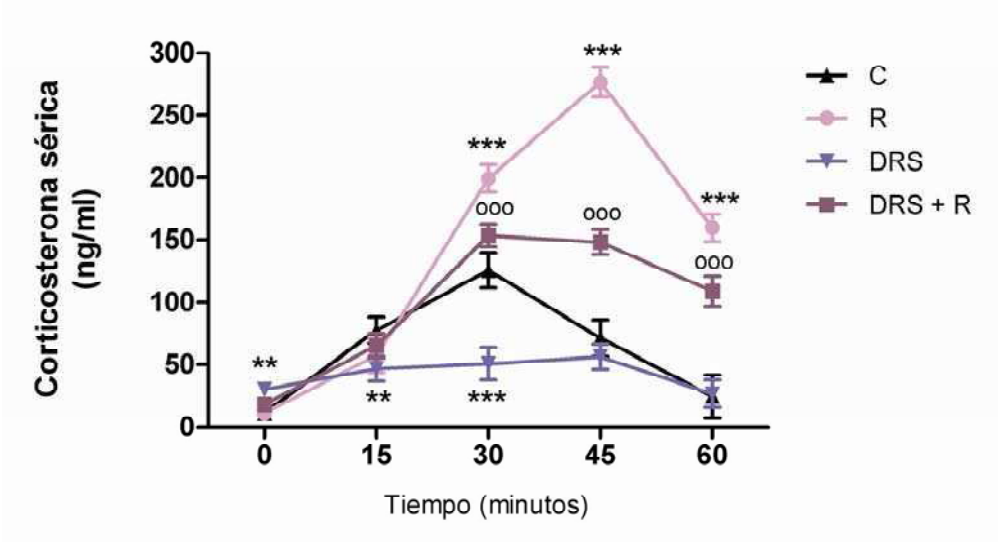
Analizamos a continuación el efecto del tratamiento farmacológico sobre las alteraciones observadas en la funcionalidad adrenal. Para ello se midieron los niveles basales de corticosterona sérica y se realizó la prueba de estimulación aguda con ACTH exógena. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con RSG evitó las modificaciones en ambos

parámetros que se encontraron en los animales alimentados con DRS (figura 34).

A



B



C

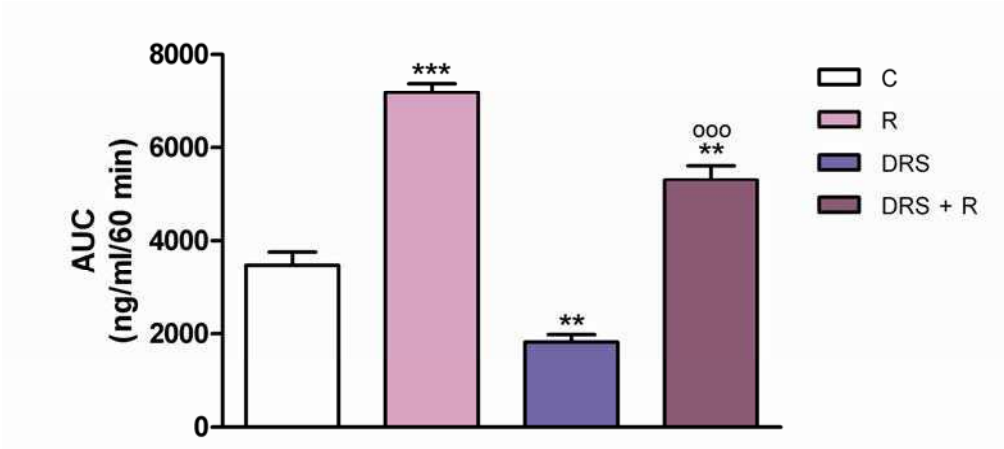
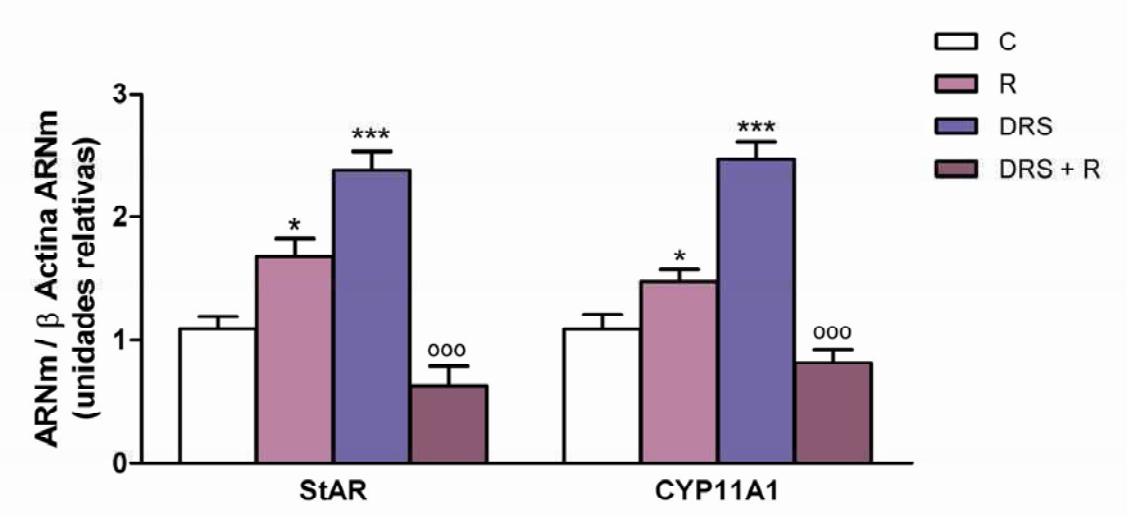


Figura 34: ***Corticosteronemia basal y prueba de estimulación con ACTH.*** *Se determinaron por RIA los niveles de corticosterona basales A) y luego de la administración de una dosis de 0.4 UI/kg de ACTH (ensayo de estimulación aguda) B) en el suero de animales controles (C), tratados con rosiglitazona 4 mg/kg (R), con dieta (DRS) y con ambos tratamientos (DRS +R). En C) se observa el área bajo la curva del ensayo de estimulación aguda con ACTH. Se indica la media ± SEM para n= 6.* $^{***}p< 0.001$, $^{**}p< 0.01$, $^{*}p< 0.05$ *vs. el grupo control y* $^{ooo}p<0.001$ *vs. el grupo con DRS, por el test de Tukey.*

El análisis por RT-PCR en tiempo real indicó que el tratamiento con rosiglitazona previno la modificación en los niveles de mensajeros de StAR, CYP11A1 y MC2R generada por la modificación dietaria (figura 35).

A



B

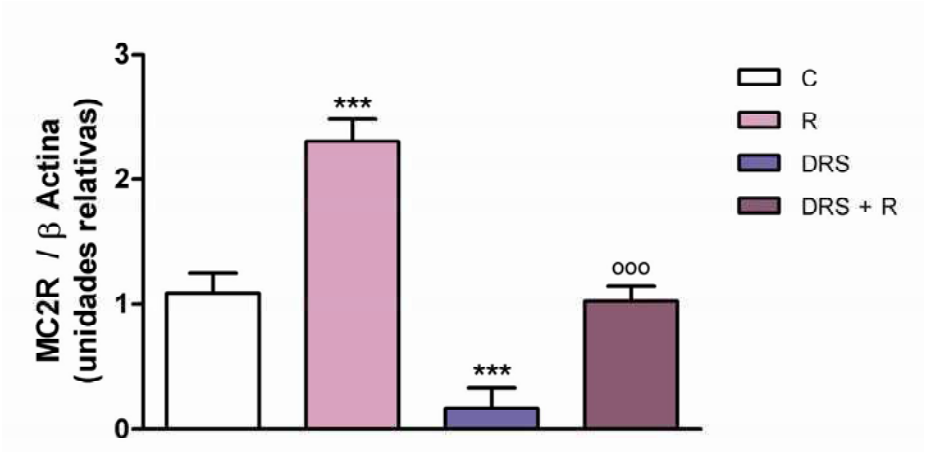
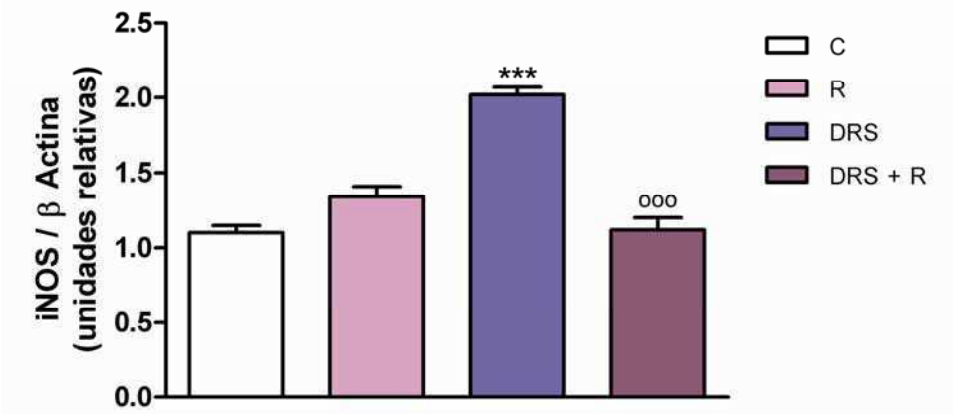


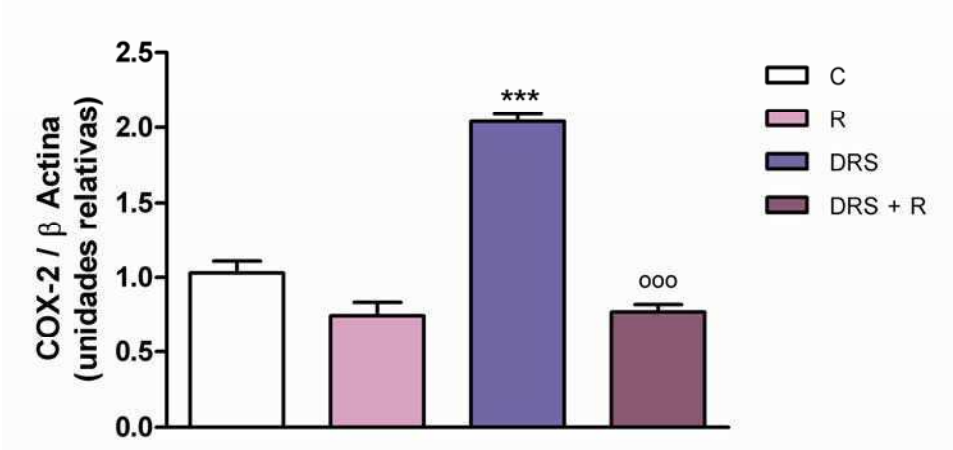
Figura 35: ***Efecto de la rosiglitazona sobre la expresión de StAR, CYP11A1 y MC2R en la corteza adrenal.*** *Se determinaron los niveles de ARNm de StAR y CYP11A1 (A) y de MC2R (B) por RT-PCR en tiempo real sobre ARN total obtenido de la corteza adrenal de animales de los grupos ya descriptos: C, R, DRS y DRS + R. Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{***}p<0.001$, $^{*}p<0.05$ vs. el grupo control y $^{ooo}p<0.001$ vs. el grupo DRS, por el test de Tukey.*

A continuación analizamos el efecto de la rosiglitazona sobre los sistemas moduladores autócrinos/parácrinos de la esteroidogénesis adrenal. Con ese fin, estudiamos los niveles de expresión de las isoformas inducibles de la óxido nítrico sintasa, la ciclooxigenasa y la hemooxigenasa (iNOS, COX-2 y HO-1). Como se observa en la figura 36, el tratamiento con rosiglitazona evitó el aumento en la expresión proteica de iNOS, COX-2 y HO-1 así como el aumento en la actividad enzimática de NOS.

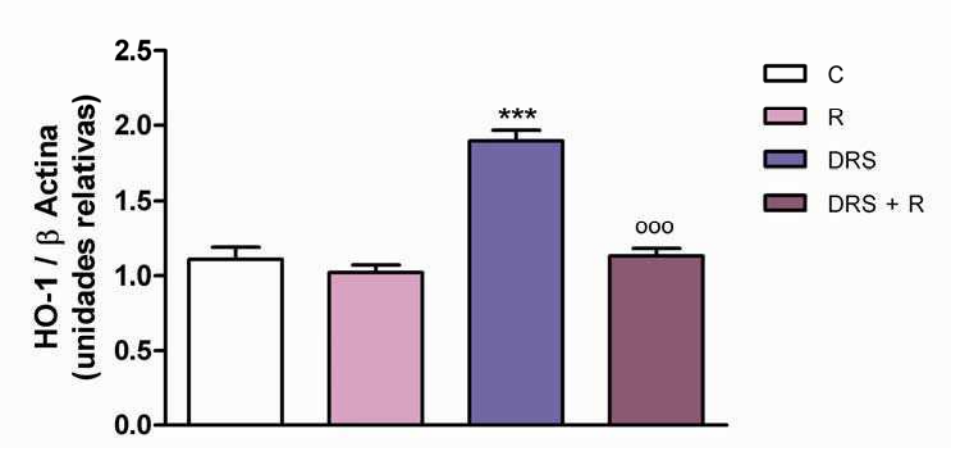
A



B


COX-2 / β Actina
(unidades relativas)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
ooo
C
R
DRS
DRS + R

C


HO-1 / β Actina
(unidades relativas)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
ooo
C
R
DRS
DRS + R

D

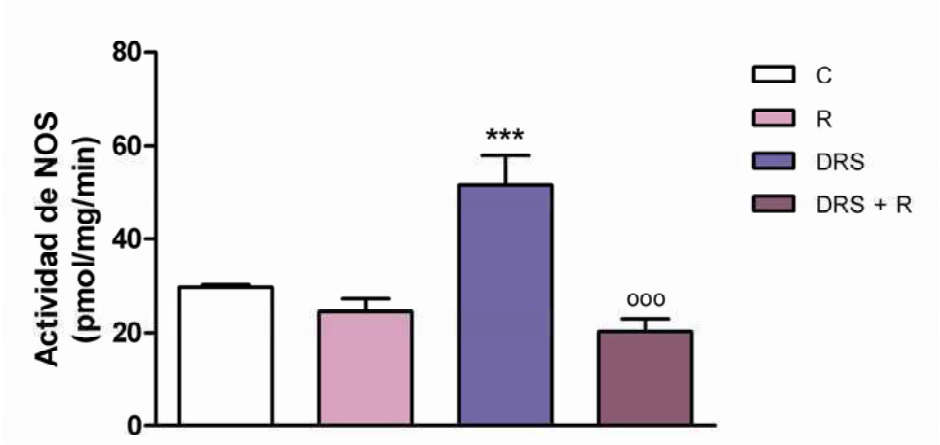


Figura 36: ***Efecto de la rosiglitazona sobre la expresión de iNOS, COX-2, HO-1 y la actividad de NOS en la corteza adrenal.*** *Se muestran los niveles de proteína de iNOS, COX-2 y HO-1 (A-C) medidos por inmunoblot. La actividad de NOS (D) fue determinada como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Se indica la media ± SEM para n= 6. ***p< 0.001 vs. el grupo control, ooop<0.001 vs. el grupo DRS, por el test de Tukey.*

Por otro lado analizamos los niveles de ARNm de IL-1 β, TNF-α y F4/80 por PCR de tiempo real. Como se muestra en la figura 37, el tratamiento con rosiglitazona impidió el aumento tanto de los niveles de expresión de IL-1 β, TNF-α como F4/80.

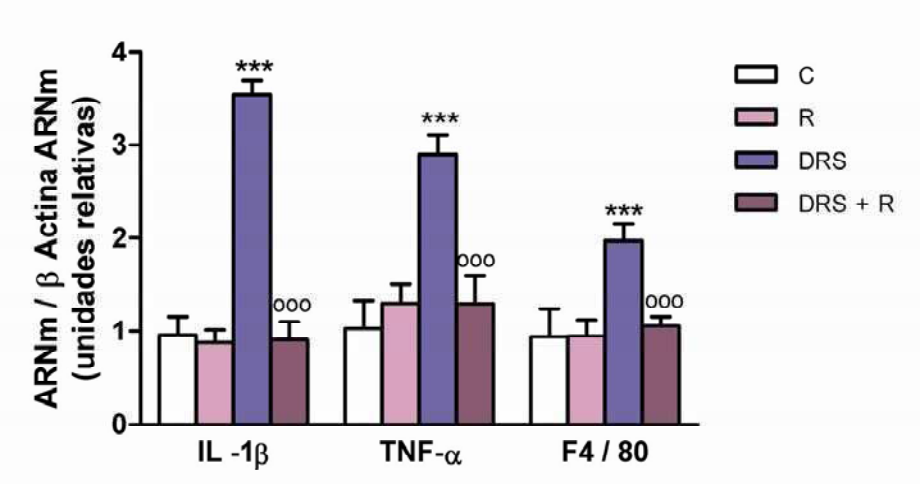
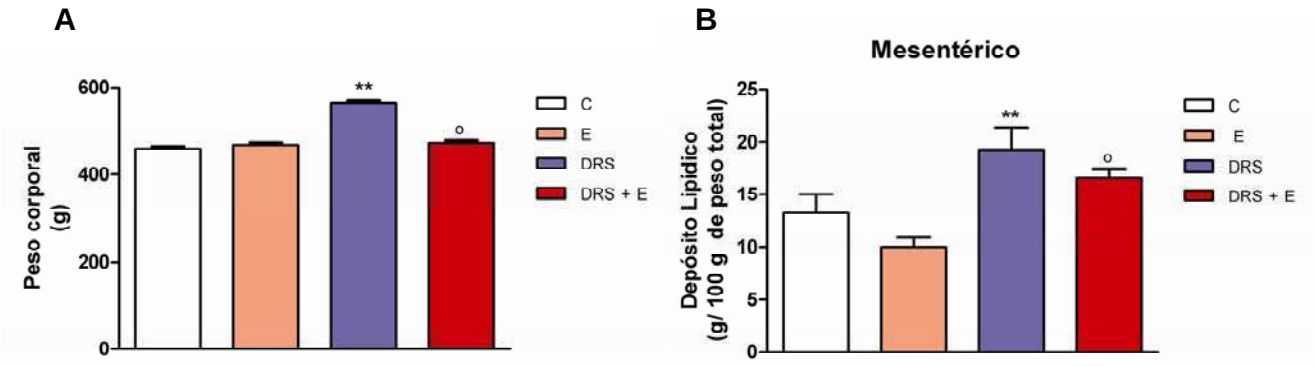


Figura 37: ***Efecto de la rosiglitazona sobre la expresión de IL-1 β, TNF-α y F4/80 e en corteza adrenal.*** *Los niveles de ARNm de IL-1β, TNF-α y F4/80 fueron determinados como se describe en Materiales y Métodos. Se indica la media ± SEM para n= 6. ***p<0.001 vs. el grupo control, ooop<0.001 vs. el grupo DRS, por el test de Tukey.*

EFECTOS DEL EJERCICIO MODERADO

La implementación de un régimen de ejercicio moderado ha probado ser eficaz en favorecer la insulinosensibilidad tanto en pacientes como en modelos animales de IR. En base a ello, se analizó su efecto en animales controles y alimentados con una dieta enriquecida en sacarosa. En los primeros experimentos se evaluó el efecto de una rutina de ejercicio moderado (ver Materiales y Métodos) sobre la evolución del peso corporal y de los depósitos lipídicos durante 7 semanas de tratamiento con una dieta rica en sacarosa. Como se observa en la figura 38, el ejercicio evitó el aumento de peso corporal y de los depósitos lipídicos en los animales que recibieron la dieta enriquecida con respecto al grupo sedentario.



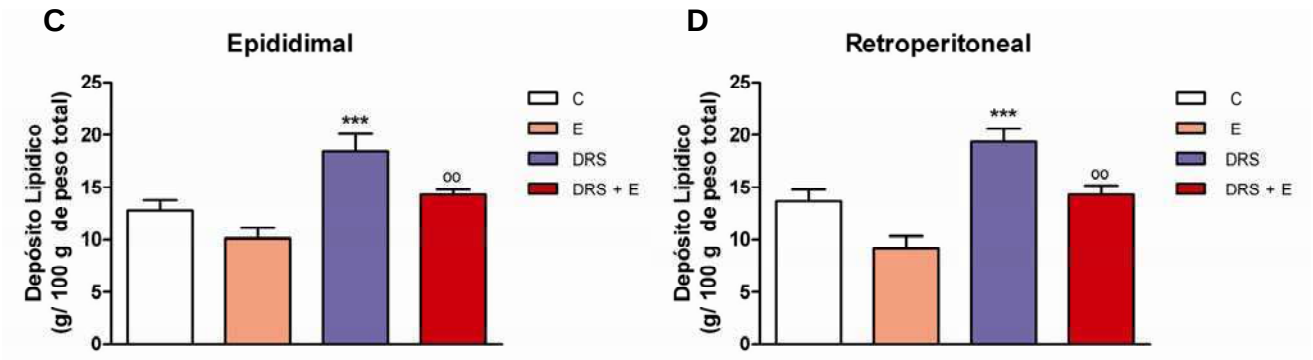
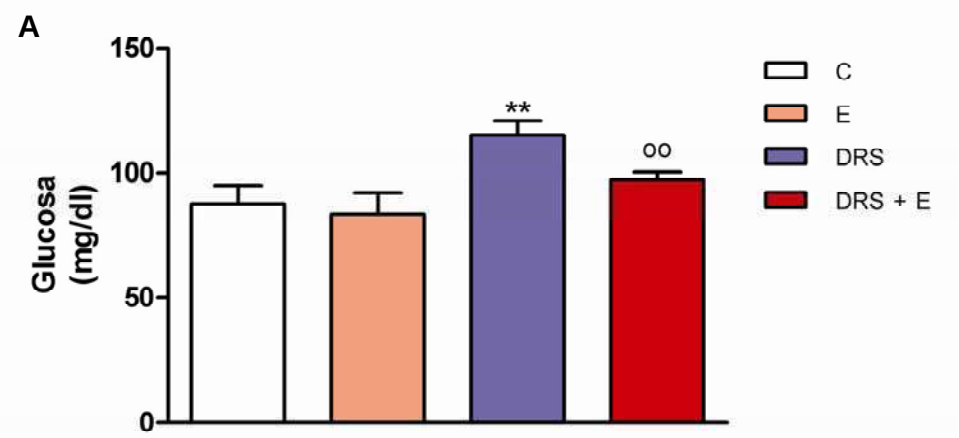
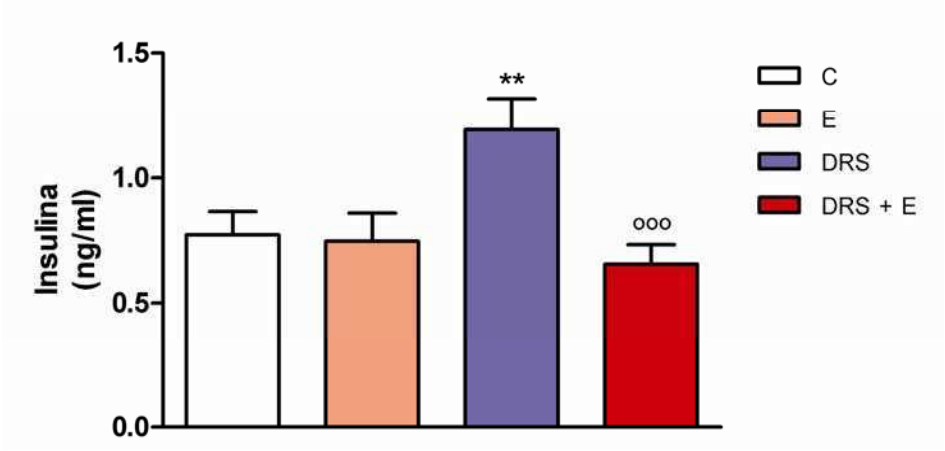


***Figura 38**: **Efecto del ejercicio sobre el peso corporal y de los depósitos lipídicos.** Peso corporal (A), y peso relativo de grasas mesentérica (B), epididimal (C) y retroperitoneal (D) con respecto al peso corporal en animales controles y animales que recibían la dieta suplementada con sacarosa, con (E; DRS + E) o (C ; DRS) sin régimen de ejercicio. Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{***}p<0.001$, $^{**}p<0.01$ vs control y $^{oo}p<0.01$, $^{o}p<0.05$ vs. DRS por el test de Tukey.*

Los animales sometidos al régimen de ejercicio y a la modificación dietaria presentaron niveles de glucosa, insulina y triglicéridos séricos comparables a los de los animales controles (figura 39).



B



C

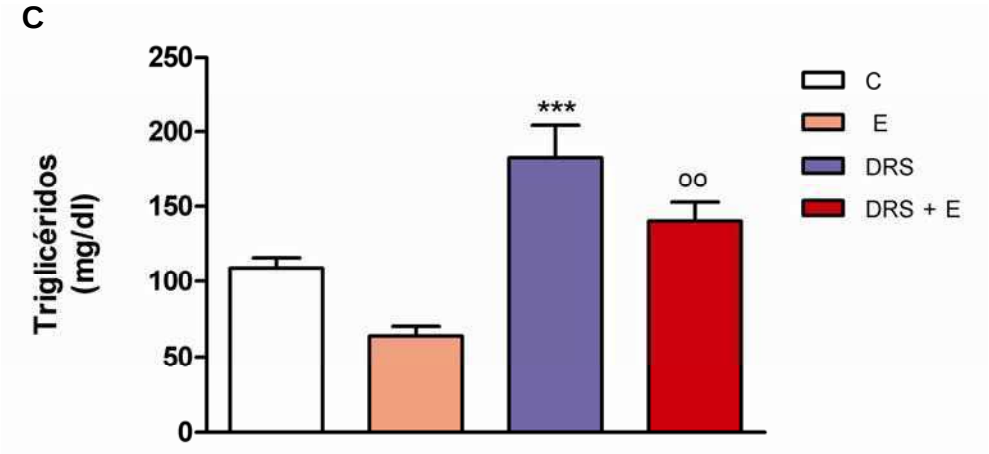


Figura 39: ***Efecto del ejercicio sobre la glucemia, insulinemia y trigliceridemia.*** *Se determinaron los niveles de glucosa (A), insulina (B) y triglicéridos (C) en el suero de animales de los grupos C y DRS con (E; DRS + E) o sin régimen de ejercicio (C, DRS). Se indica la media ± SEM para n= 6.* $^{**}p<0.01$ *y* $^{***}p<0.001$ *vs. el grupo control,* $^{oo}p<0.01$ *y* $^{ooo}p<0.001$ *vs. el grupo con DRS, por el test de Tukey.*

Para evaluar el efecto del ejercicio sobre el estado de insulinorresistencia, realizamos una prueba de tolerancia a la insulina. Los resultados indicaron que el grupo sometido al protocolo de ejercicio y dieta mostró una sensibilidad a la insulina similar a la del grupo control, lo que sugiere que el protocolo de ejercicio impidió el establecimiento del estado de insulinorresistencia (figura 40).

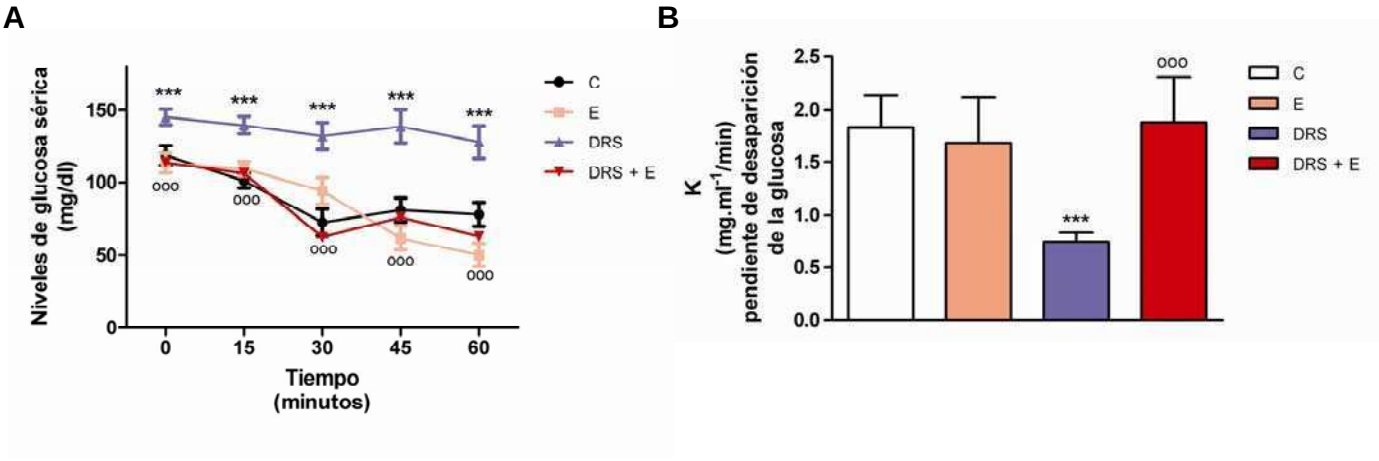


Figura 40: ***Test de tolerancia a la insulina.*** *Se realizó la prueba como se describe en Materiales y Métodos tomando muestras de sangre luego de 15, 30, 45 y 60 minutos de la inyección de insulina (dosis 0.75 UI/ml) en animales de los grupos C y DRS con (E; DRS + E) o sin régimen de ejercicio (C, DRS). Se muestran los niveles de glucosa séricos (A) y la pendiente de desaparición de glucosa (B). Se indica la media ± SEM para n= 6. $^{***}p<0.01$ vs. el grupo control, $^{ooo}p<0.001$ vs. el grupo DRS, por el test de Tukey.*

Una vez establecida la eficacia del tratamiento, se analizaron los efectos del ejercicio sobre las alteraciones funcionales y morfológicas previamente observadas a nivel adrenal en el grupo DRS. Para ello se examinó, en primera instancia, el peso de las glándulas adrenales de los grupos sedentarios (C y DRS) y los grupos sometidos al régimen de ejercicio (C +E y DRS + E). La figura 41 muestra que el ejercicio atenuó el efecto de la dieta sobre este parámetro.

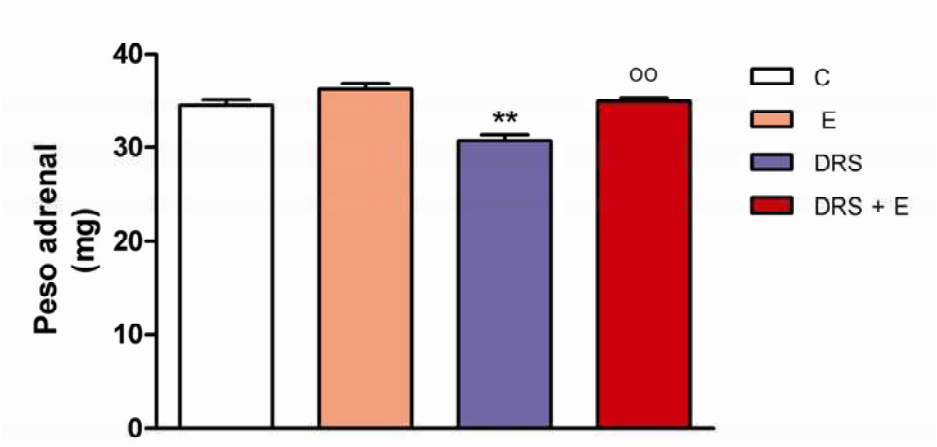


***Figura 41*: Peso de las glándulas adrenales.** *Se indica el peso de las glándulas adrenales en los mismos grupos de animales descriptos en Materiales y Métodos. Se muestra la media ± SEM para n= 6. $^{**}p<0.01$ vs. el grupo control, $^{oo}p<0.01$ vs. el grupo DRS, por el test de Tukey.*

Como se mostró previamente, la administración de una DRS produce una disrupción del arreglo trabecular, acumulación de lípidos y en particular de triglicéridos a nivel de la *zona fasciculata* de la corteza adrenal. Para evaluar si el régimen de ejercicio afectaba estos parámetros se realizó un análisis histoquímico de cortes de corteza adrenal mediante la coloración con tricrómico de Masson y Sudan III que permitió evaluar la topografía de la glándula y la presencia de lípidos neutros en el tejido. Asimismo se midieron los niveles de triglicéridos y colesterol en homogenatos adrenales. Como se observa en la figura 42 y 43, el régimen de ejercicio previno las alteraciones morfológicas así como la acumulación de lípidos neutros en la corteza adrenal y el incremento de los niveles de triglicéridos en la adrenal en los animales que recibieron la dieta enriquecida en sacarosa sin alterar los niveles de colesterol adrenales.

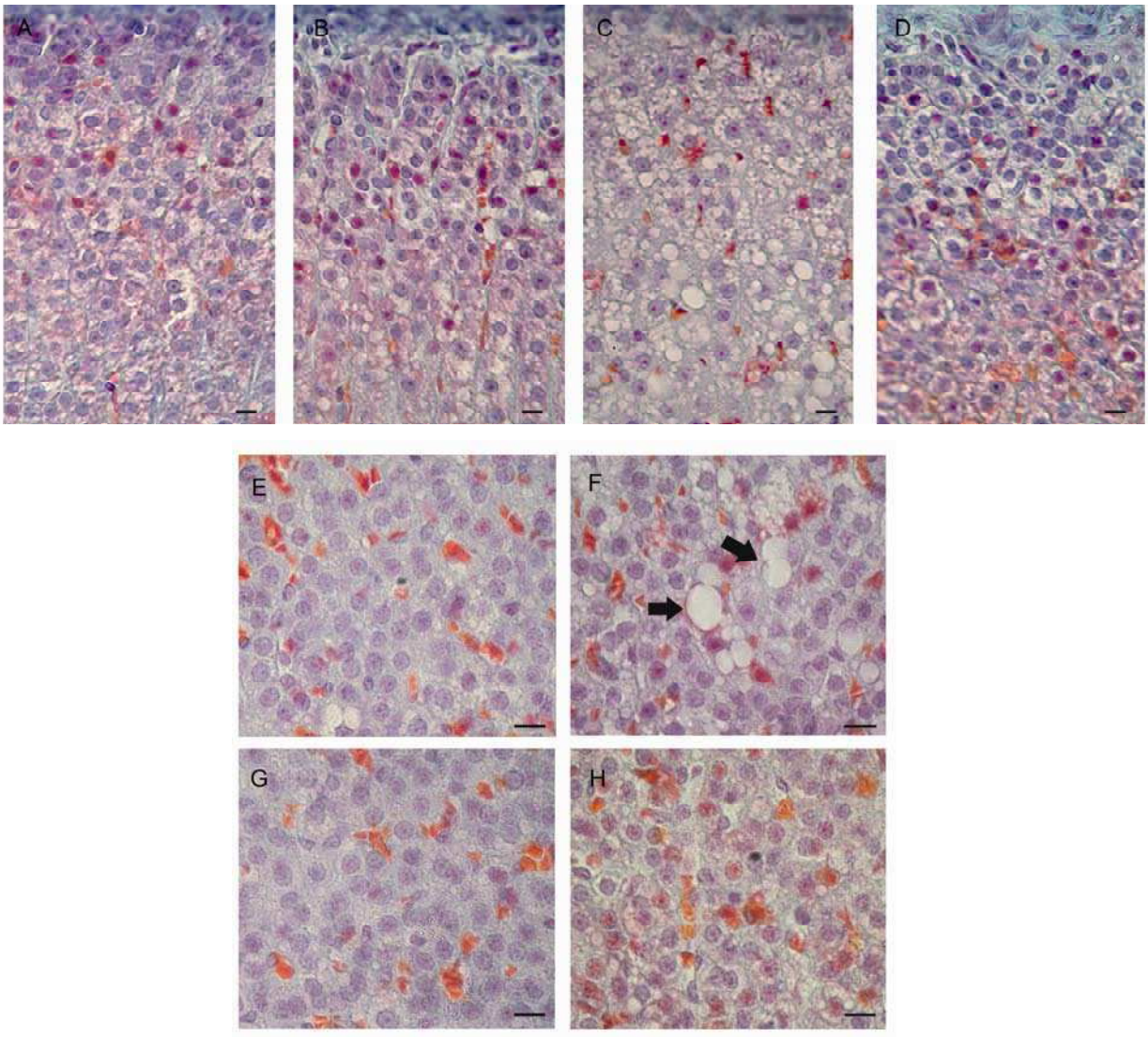
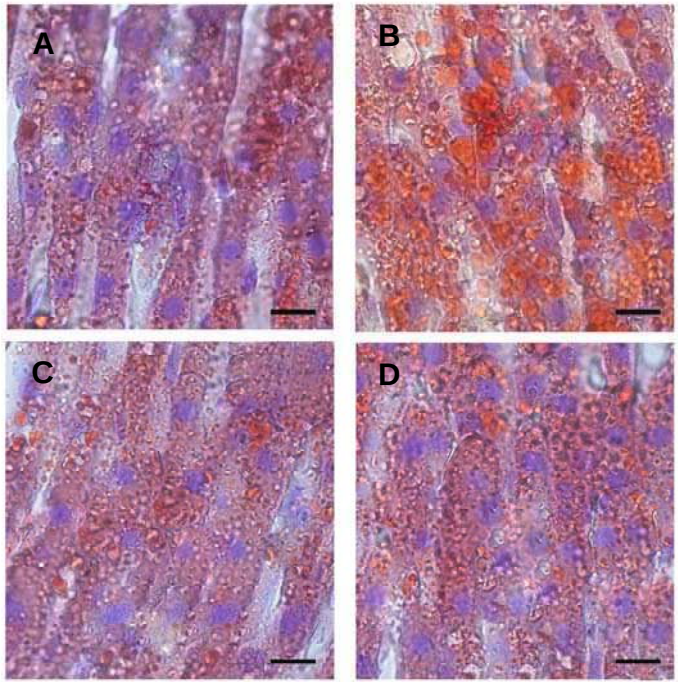
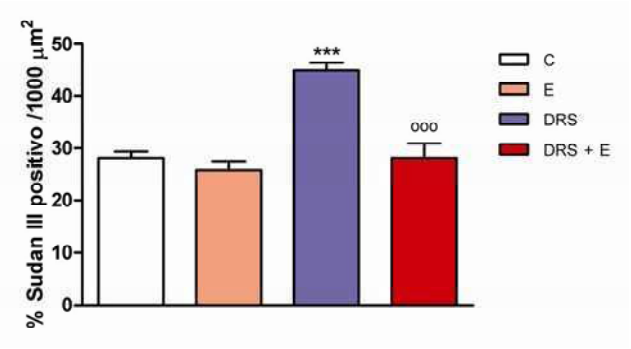


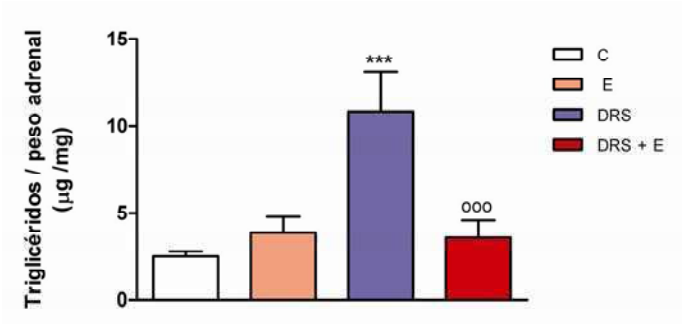
***Figura 42**: **Tinción con tricrómico de Masson de cortes de glándula adrenal.** Se colorearon cortes de 5 µm obtenidos de glándulas adrenales de animales controles (A y E), ejercitados (B y F), con la dieta (C y G) y con la dieta + ejercicio (D y H). En los paneles A-D la barra negra es igual a 10 µm y en los paneles E -H es igual a 5 µm. Las flechas negras (D) muestran los espacios dejados por los depósitos lipídicos.*



E



F



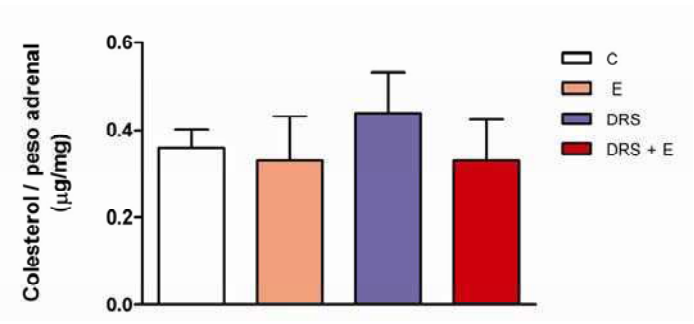


***Figura 43**: **Efecto del ejercicio sobre la acumulación de lípidos en la corteza adrenal.** En (A-D) se muestran la coloración con Sudan III de cortes de corteza adrenal (5 µm; 600X) de animales controles y de los que recibieron la dieta suplementada con sacarosa sometidos al régimen de ejercicio (E (panel C); DRS + E (panel D)) o (C (panel A); DRS (panel B)) sedentarios. En (E) se muestran la cuantificación del porcentaje de área Sudan III positivo en el área corticoadrenal y en (F) los niveles de triglicéridos y colesterol determinados en homogenatos adrenales obtenidos de los mismos grupos experimentales. Se indica la media ± SEM para n= 6, $^{***}p < 0,001$ vs. el grupo control, $^{ooo}p<0,001$ vs. el grupo con DRS, por el test de Tukey.*

Luego analizamos el efecto el ejercicio sobre los niveles de expresión de PPARγ y uno de sus genes blanco CD36. El ejercicio evitó el aumento en la expresión de PPARγ pero estimuló el aumento de la expresión de CD36 en los animales que recibían la dieta con sacarosa (figura 44).

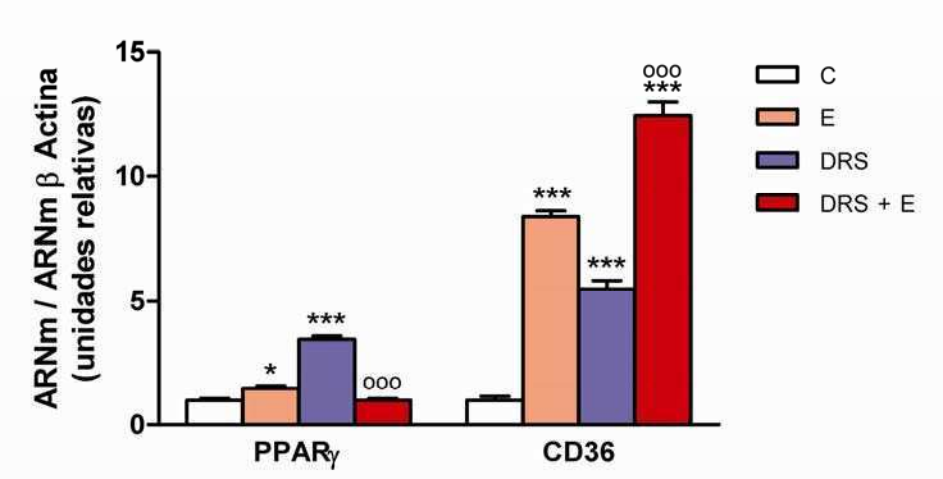
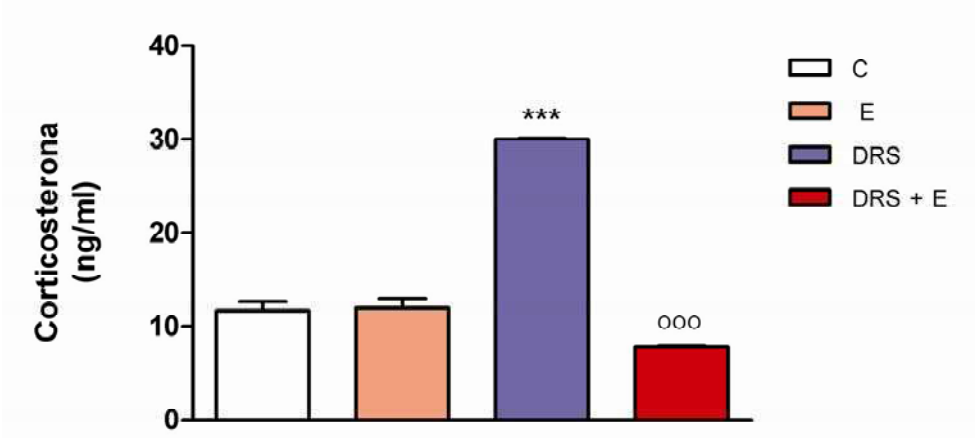


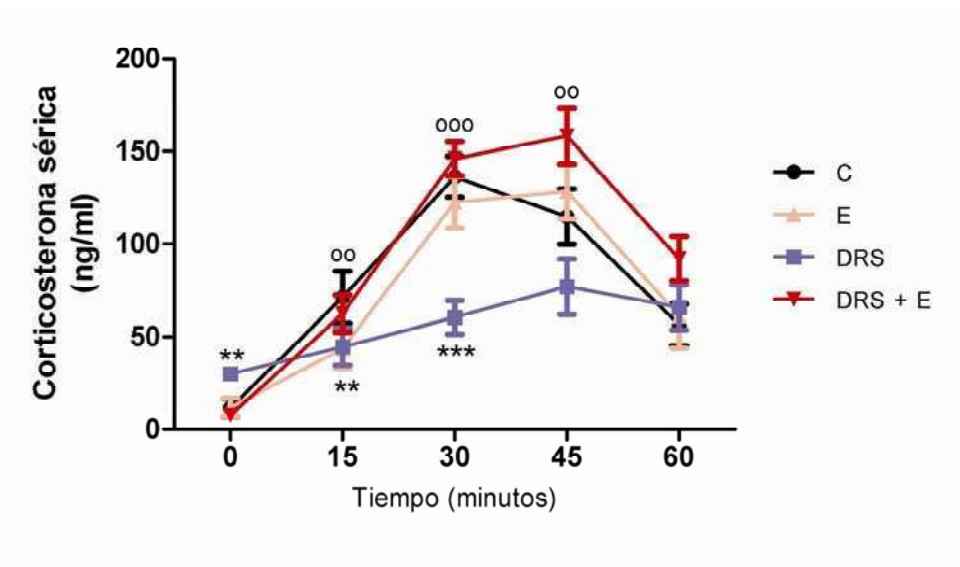
Figura 44: ***Efecto del ejercicio sobre los niveles de ARNm de PPAR-γ y CD36 en corteza adrenal.*** *Se determinaron los niveles de ARNm de PPAR-γ y CD36 RT-PCR en tiempo real realizada sobre ARN total obtenido de los grupos C, DRS, E, DRS + E. Se indica la media ± SEM para n= 6, $^{***}p< 0,001$, $^{**}p< 0,01$ vs. el grupo control; $^{ooo}p<0,001$ y $^{oo}p<0,01$ vs. el grupo con DRS, por el test de Tukey.*

Para analizar el efecto del ejercicio sobre la funcionalidad adrenal, se midieron los niveles de corticosterona basal y se realizó una prueba de estimulación aguda de la esteroidogénesis adrenal con un pulso de ACTH exógeno (figura 45). Como puede observarse en la figura, el régimen de ejercicio evitó los cambios en los niveles basales de corticosterona en sangre (medidos en horas de la mañana) y en la respuesta al estimulo agudo de ACTH de los animales del grupo DRS.

A


Corticosterona (ng/ml)
40
30
20
10
0
***
ooo
C
E
DRS
DRS + E

B


Corticosterona sérica (ng/ml)
200
150
100
50
0
oo
ooo
oo
**
**
***
0
15
30
45
60
Tiempo (minutos)
C
E
DRS
DRS + E

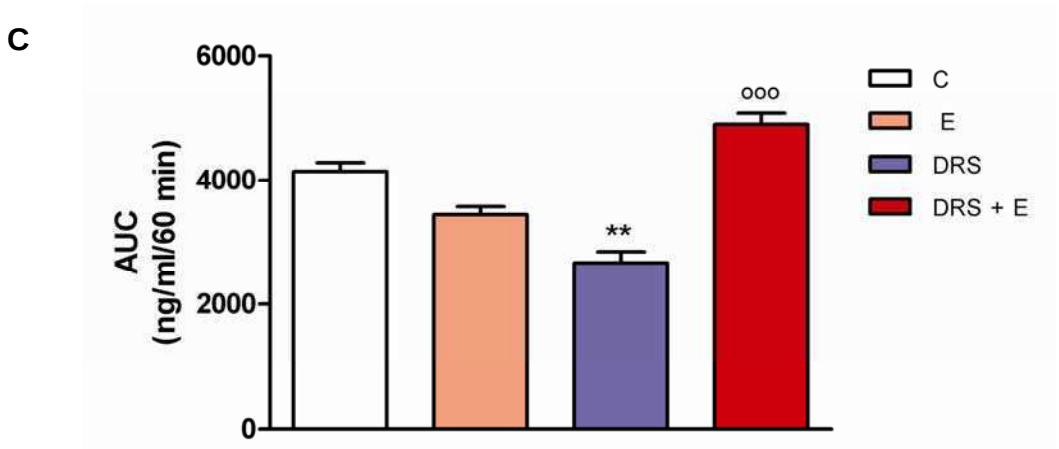
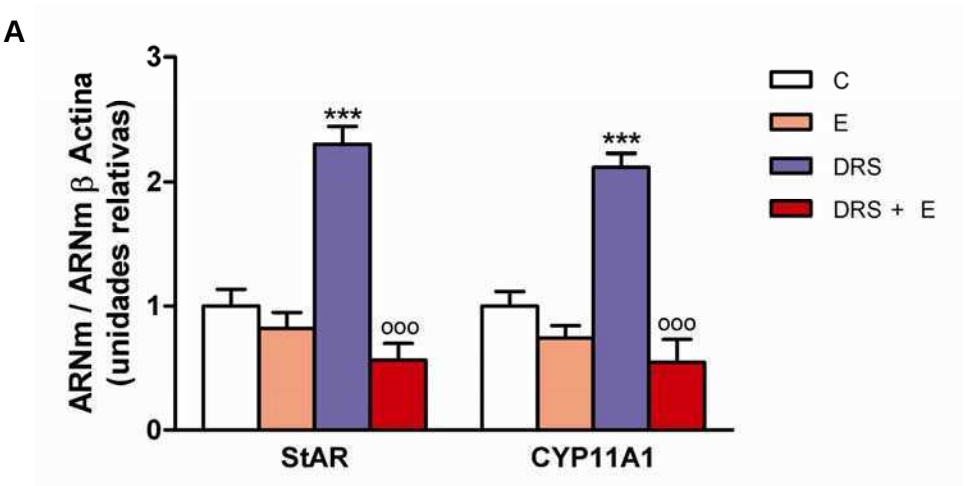


Figura 45: ***Efecto del ejercicio sobre la corticosteronemia basal y la prueba de ACTH.*** *Se determinaron los niveles de corticosterona séricos basales (A) y luego de una dosis de 4 UI/kg de ACTH (ensayo de estimulación aguda) (B) en animales de los grupos C, DRS, DRS + E y E. En C) se observa el área bajo la curva del ensayo de estimulación aguda con ACTH Se indica la media ± SEM para n= 6, $^{***}p< 0,001$, $^{**}p< 0,01$ vs. el grupo control; $^{ooo}p<0,001$; $^{ooo}p<0,01$ vs. el grupo DRS, por el test de Tukey.*

Luego evaluamos por PCR en tiempo real los niveles de mensajero de StAR y CYP11A1, proteínas clave en la regulación de la esteroidogénesis, y los niveles de expresión del receptor de ACTH (MC2R) en la corteza adrenal. La figura 46 muestra que el ejercicio evitó las modificaciones en los niveles de expresión de StAR, CYP11A1 y MC2R observadas en los animales alimentados con la dieta rica en sacarosa.



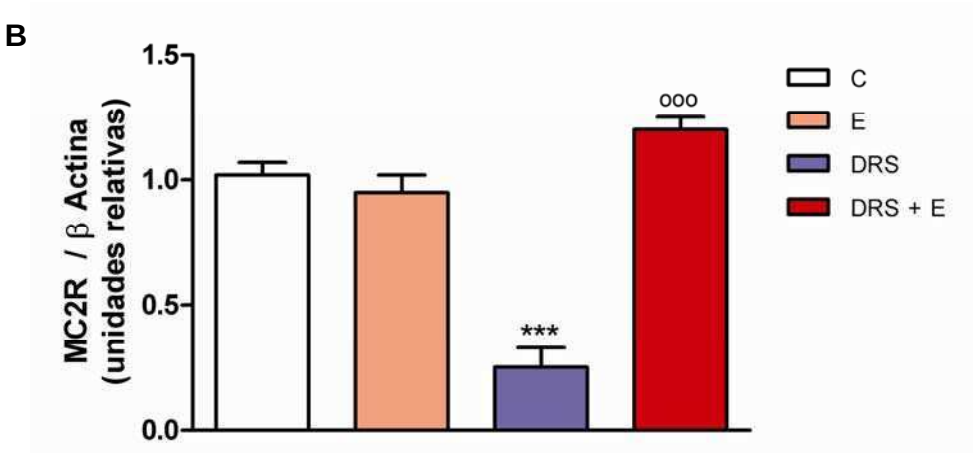
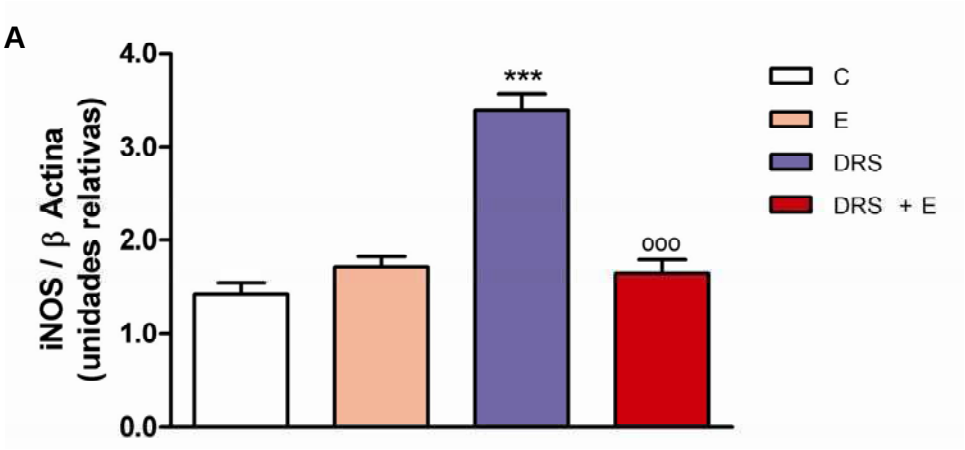
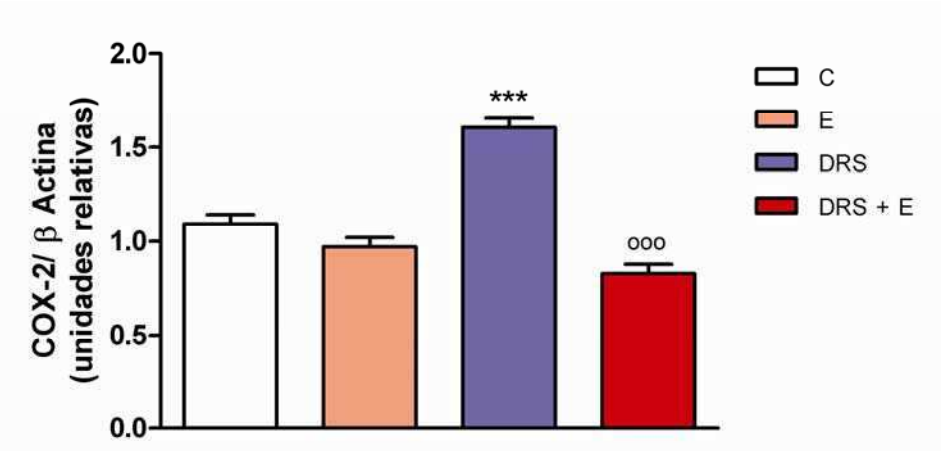


Figura 46: ***Expresión de StAR, CYP11A1 y MC2R en corteza adrenal.*** *Se determinaron los niveles de ARNm de StAR, CYP11A1 (A) y MC2R (B) por RT- PCR en tiempo real sobre ARN total obtenido de corteza adrenal de ratas de los grupos C, E, DRS y DRS + E. Se indica la media ± SEM para n= 6, $^{***}p < 0,001$ vs. el grupo control y $^{ooo}p<0,001$ vs. el grupo DRS, por el test de Tukey.*

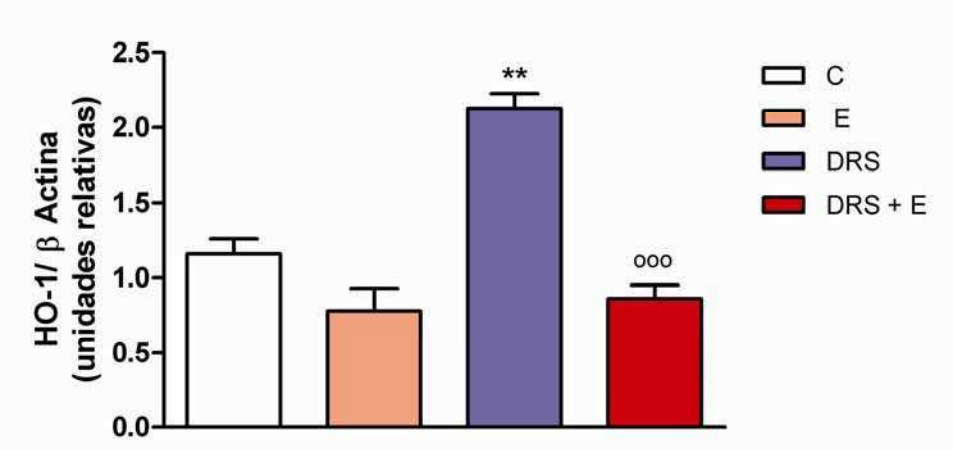
Posteriormente analizamos el efecto del ejercicio sobre los sistemas modulatorios de la esteroidogénesis adrenal. La figura 47 muestra que el ejercicio también evitó el aumento en los niveles de expresión de iNOS, COX-2 y HO-1 así como en la actividad de NOS total en la corteza adrenal.



B


COX-2/ β Actina
(unidades relativas)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
ooo
C
E
DRS
DRS + E

C


HO-1/ β Actina
(unidades relativas)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
ooo
C
E
DRS
DRS + E

D

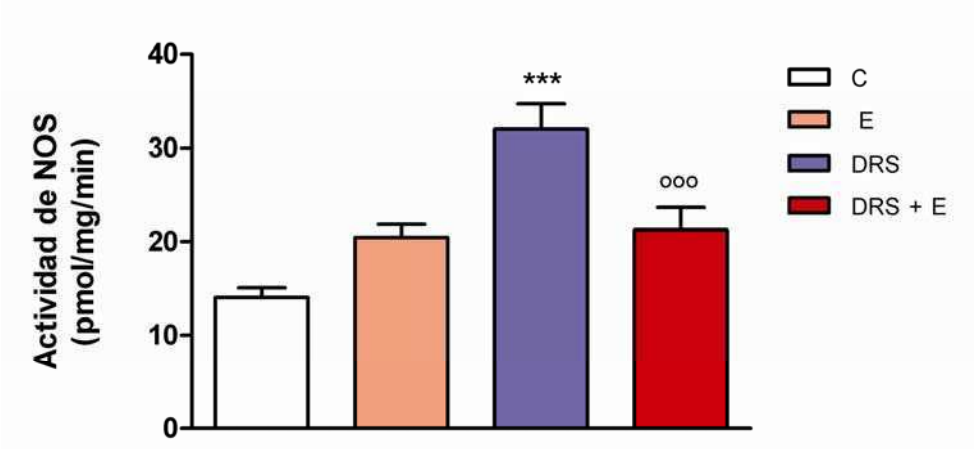


Figura 47: ***Expresión de COX-2, HO-1 y actividad de NOS en corteza adrenal*** *(A-C) Se determinaron los niveles proteicos de COX-2, HO-1y β actina por inmunoblot y (D) la actividad enzimática de NOS en homogenatos de corteza adrenal de animales de los grupos C, E, DRS y DRS + E. Se indica la media ± SEM para n= 6, $^{***}p< 0,001$, $^{**}p< 0,01$ vs. el grupo control; $^{ooo}p<0,001$ vs. el grupo DRS, por el test de Tukey.*

Analizamos los niveles de ARNm de IL1-β, TNF-α y F4/80 por RT-PCR en tiempo real. Como muestra la figura 48, el ejercicio evitó el aumento tanto de IL1-β, TNF-α y F4/80 en los animales alimentados con DRS.

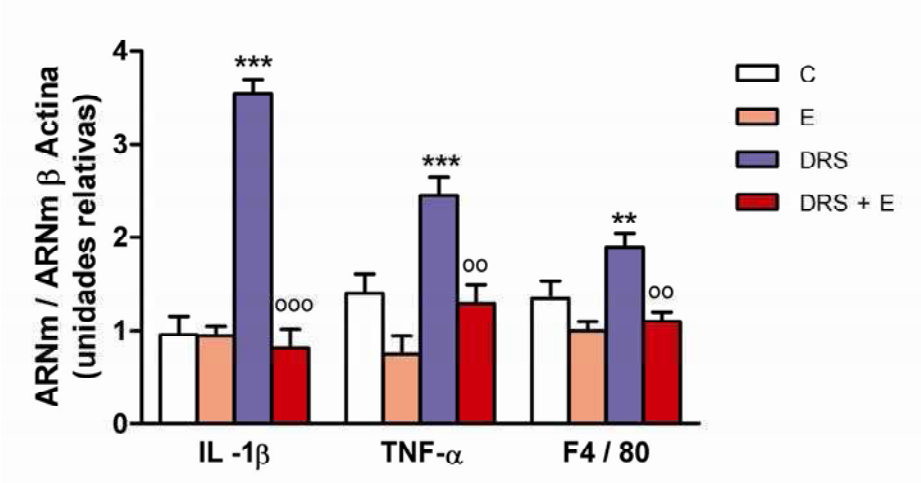


Figura 48: ***Efecto del ejercicio sobre los niveles de ARNm de IL-1β, F4/80 y TNF-α en corteza adrenal.*** *Se determinaron los niveles de ARNm de IL1-β, TNF-α y F4/80 por RT-PCR en tiempo real realizada sobre ARN total obtenido de los grupos C, DRS, E, DRS + E. Se indica la media ± SEM para n= 6, $^{***}p< 0,001$, $^{**}p< 0,01$ vs. el grupo control; $^{ooo}p<0,001$ y $^{oo}p<0,01$ vs. el grupo con DRS, por el test de Tukey.*

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que ratas Wistar macho adultas alimentadas con una dieta rica en sacarosa (DRS) desarrollan un estado de insulinorresistencia (IR) acompañado por cambios morfológicos en la corteza adrenal. Más aún, estos animales presentan una disfunción adrenal con mayores niveles basales de glucocorticoides séricos y una menor respuesta esteroidogénica a la ACTH exógena.

Diversos estudios han demostrado que las dieta ricas en sacarosa generan un profundo impacto en la acumulación y distribución de reservas energéticas tanto en humanos como en animales [129-131]. La sacarosa proveniente de la dieta es hidrolizada a fructosa y glucosa en el intestino. La fructosa generada es metabolizada principalmente en el hígado incorporándose a la vía glucolítica luego del paso regulatorio de la misma, por lo que se convierte rápidamente en piruvato y finalmente en ácidos grasos libres (AGL). Estos AGL, tras ser esterificados formando TG, son empaquetados en lipoproteínas junto a colesterol en distintas proporciones y pasan finalmente a la circulación formando parte principalmente de las VLDL. Los TG de las lipoproteínas son hidrolizados por la actividad de lipoproteína lipasa y captados, esterificados y almacenados fundamentalmente en el tejido adiposo.

En nuestro modelo experimental, los animales que recibieron 30%de sacarosa en el agua de bebida presentaron, por comparación al grupo control, un mayor consumo calórico en todas las semanas analizadas a pesar de disminuir la ingesta de alimento balanceado (datos no mostrados). Este aumento de las calorías consumidas (fundamentalmente hidratos de carbono simples), resultó en un incremento en el peso de los depósitos lipídicos (desde la 5ta semana) y en el peso corporal (desde la 7ma semana) de estos animales.

En cuanto a los lípidos circulantes, los niveles séricos de TG en los animales del grupo DRS fueron significativamente mayores desde las primeras semanas de tratamiento, mientras que los niveles de colesterol no-HDL (analizados en la 7º semana) también fueron superiores a los del

grupo control. En forma análoga se ha demostrado que un aumento en la ingesta de fructosa produce mayores niveles de colesterol no-HDL y TG tanto en humanos como en roedores [132, 133].

También, Lindqvist et al. demostraron un incremento en el consumo calórico, que relacionaron con el aumento en el peso corporal, en ratas alimentadas con sacarosa (23%) en el agua de bebida durante dos semanas [134]. Sin embargo, en condiciones semejantes, otros autores observaron que el incremento del consumo calórico no afectaba el peso corporal [135].

Independientemente del efecto de la dieta sobre el peso corporal, existe consenso en la bibliografía en que este tipo de dieta genera un aumento significativo en el peso de los depósitos lipídicos y en los niveles sanguíneos de TG y ácidos grasos libres en estos animales [129, 134].

En nuestro modelo experimental, los animales mostraron niveles circulantes incrementados de glucosa e insulina en todas las semanas analizadas: la instauración del estado de insulinorresistencia fue confirmada por la prueba de tolerancia a la insulina realizada en la séptima semana de tratamiento.

En este sentido, diversos autores han demostrado que el consumo de dietas con alto contenido de sacarosa genera IR [136-138].

EFECTOS DE LA DIETA RICA EN SACAROSA SOBRE LA MORFOLOGÍA Y FUNCIONALIDAD ADRENAL

Dado que se ha postulado la existencia de una relación entre la generación de IR y alteraciones en la regulación de la producción y/o el metabolismo de los glucocorticoides [67, 139] decidimos estudiar la morfología y la funcionalidad de la corteza adrenal en este modelo animal de IR.

El examen macroscópico de las glándulas adrenales de los animales del grupo DRS indicó una leve atrofia, ya que tanto su tamaño como su peso fueron significativamente menores al los de sus correspondientes

controles. Resultados similares se encuentran en animales hipofisectomizados o en tratamiento con glucocorticoides exógenos [140]. El análisis histoquímico también indicó cambios en la morfología de la corteza adrenal con una disrupción en la disposición trabecular de la *zona fasciculata*, sin efectos aparentes sobre el grosor de la capa. El tejido obtenido de los animales del grupo DRS mostró una marcada infiltración por lípidos neutros, concentrados en gotas lipídicas con niveles incrementados de TG, sin observarse cambios en el contenido de colesterol tisular.

Como ya se mencionó, diversos autores demostraron que la alimentación con dietas ricas en sacarosa genera un aumento considerable en la síntesis de TG hepáticos así como un aumento de los AGL circulantes, de la acumulación de lípidos en el tejido adiposo (principalmente abdominal) y de los depósito ectópico de TG, por ejemplo en hígado (esteatosis no alcohólica) y músculo [141, 142]. Al igual que en otros tejidos, en la corteza adrenal, una oferta de ácidos grasos que sobrepase las necesidades energéticas del tejido puede ocasionar un incremento en la síntesis local de TG y en su depósito tisular. A su vez, esta acumulación de ácidos grasos como TG, podría cumplir un rol de protección contra los efectos deletéreos ejercidos por los ácidos grasos libres o por metabolitos como el diacilglicerol, las ceramidas, etc. [22, 143]. En nuestro conocimiento no hay evidencias previas publicadas en relación a la acumulación ectópica de lípidos en la corteza adrenal de ratas alimentadas con dietas ricas en sacarosa.

Como se discutirá más adelante, nuestros resultados muestran que los animales alimentados con DRS expresan en la corteza adrenal mayores niveles de PPARγ y de uno de sus genes blanco (CD36 o FAT) en relación a los controles correspondientes. Es posible que los ácidos grasos *per se* (o alguno de sus metabolitos) actúen como ligandos endógenos de PPARγ en la corteza adrenal de ratas tratadas con DRS, como fue descripto por Guan et al. [144]. La activación de PPARγ en la corteza adrenal, en el contexto del

estado de IR, podría resultar en la inducción de genes involucrados en la lipogénesis, como el del transportador de ácidos grasos de cadena larga de la membrana plasmática (FAT/CD36), contribuyendo así a la acumulación lipídica observada en el tejido adrenocortical. Alternativamente, el estado de inflamación crónica resultante de la generación de IR podría contribuir al depósito ectópico de lípidos [145].

En cuanto al efecto de la dieta sobre la función adrenocortical, observamos un aumento significativo en los niveles de corticosterona basal sérica (medidos durante la mañana) en los animales del grupo DRS. Esta alteración ha sido previamente descripta tanto en modelos genéticos de IR como en los inducidos por la dieta: en particular, dietas altas en grasa correlacionan positivamente con niveles aumentados de corticosterona en ratas [146, 147]. Esto podría deberse a una alteración en el metabolismo de la corticosterona en tejidos periféricos [148-151] o a la hiperactivación del eje hipotálamo-hipofisario con producción de niveles suprafisiológicos de ACTH, como ha sido previamente descripto en pacientes con IR/obesidad central [152, 153].

El aumento en la expresión de StAR y CYP11A1, dos proteínas clave involucradas en las primeras etapas de la esteroidogénesis, sugiere una mayor síntesis basal de glucocorticoides en la corteza adrenal [154-156]. Si bien nuestras evidencias no permiten descartar la contribución del eje HHA, la hipotrofia de las glándulas adrenales de los animales del grupo DRS que a su vez muestran una menor expresión del receptor de ACTH (MC2R) nos lleva a buscar una explicación alternativa, más allá de la participación de la ACTH, para justificar el incremento de los niveles basales de corticosterona séricos en nuestro modelo experimental.

Kristiansen et al. demostraron que la insulina era capaz de ejercer un efecto directo aumentando los niveles de expresión de ARN mensajero de 3βHSD y CYP17 así como incrementando los niveles de producción de cortisol en cultivo primario de células adrenocorticales humanas [78]. En

base a esto no podemos descartar que la insulina sea al menos en parte responsable del aumento en la expresión de las proteínas clave de la esteroidogénesis.

Otros factores que podrían afectar la esteroidogénesis adrenal son los ácidos grasos y otros metabolitos lipídicos que pueden generarse en la corteza adrenal en los animales con IR [157, 158]. También se ha relacionado a las prostaglandinas y a otros productos de la actividad de COX-2 con la estimulación de la esteroidogénesis adrenal [159] y en trabajo recientes de nuestro laboratorio analizamos el rol modulatorio de la actividad de COX-2 como promotor de la esteroidogénesis en la corteza adrenal [55]. En este sentido, los animales del grupo DRS mostraron un aumento en los niveles expresión de COX-2 a nivel adrenal lo que permite sugerir la participación de COX-2 en la modulación de la esteroidogénesis basal en este modelo de IR.

Dado que se ha demostrado la presencia de células del sistema inmune en la corteza adrenal, el efecto de citoquinas generadas localmente tampoco debería ser descartado [160]. En particular, nuestros resultados muestran que existe un aumento en el marcador F4/80, expresado en forma selectiva por los macrófagos maduros, y en la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1β y TNF-α en la corteza adrenal de los animales del grupo DRS. Se ha señalado además que la esteroidogénesis adrenal puede ser modificada por diversas citoquinas y adipoquinas circulantes [161-164]. La disminución en los niveles de adiponectina descripta en pacientes con insulinorresistencia [165], podría contribuir al aumento en los niveles de corticosterona basal y al incremento en la expresión de StAR y CYP11A1 observada en nuestro modelo animal, ya que, en diversas líneas celulares adrenales esta adipoquina inhibe la secreción de esteroides, tanto basal como estimulada por ACTH [166, 167].

En cuanto a los sistemas modulatorios locales de la esteroidogénesis adrenal, en trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos el rol del óxido nítrico y de la actividad de HO-1 como moduladores negativos de la esteroidogénesis adrenal [45, 48]. En concordancia, el NO generado por el incremento de la actividad de NOS, posiblemente a expensas del aumento en la expresión de iNOS y así como el incremento de HO-1podrían participar del sistema de control de la esteroidogénesis basal permitiendo el establecimiento de un nuevo "*set point*" para este parámetro. Este nuevo punto de equilibrio establecido, si bien es mayor que el de los correspondientes controles, le permitiría mantenerse dentro de límites determinados por los mecanismos homeostásicos descriptos.

Dado el incremento observado en los niveles de corticosterona basal de los animales sometidos a la DRS, el hecho de que los mismos presenten una respuesta disminuida al ACTH exógena podría ser visto como algo incongruente. Esta aparente contradicción puede ser explicada por el hecho de que, como demostramos, los animales DRS presentan menores niveles de expresión de MC2R en la corteza adrenal. Los resultados obtenidos no nos permiten establecer los mecanismos por los cuales se produciría ese efecto, así como tampoco descartar efectos deletéreos derivados de la infiltración lipídica de la glándula o de cambios en los mediadores sistémicos asociados en el estado de IR. Estos cambios son capaces de llevar a la muerte celular (por ejemplo por apoptosis) y se ponen de manifiesto cuando el sistema debe responder a una estimulación hormonal máxima.

Como se ha descripto previamente, se ha asociado la IR a un estado inflamatorio sistémico crónico [168]. Teniendo en cuenta que, tanto la iNOS como la COX-2 se inducen por la acción de endotoxinas y de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo IL-1 y el TNF-α) participando así en procesos anti-microbianos y en respuestas de citotoxicidad e inflamatorias, los resultados obtenidos permiten sugerir que la corteza

adrenal no escapa a este estado general proinflamatorio. En este sentido, el incremento en la expresión de ambas enzimas y así como de las citoquinas proinflamatorias TNF-α e IL1-β a nivel de la corteza adrenal podría relacionarse con el desarrollo de un proceso inflamatorio a nivel local. Asimismo, el rol antioxidante de la HO-1 inducida en la corteza adrenal de estos animales funcionaría, por su rol antioxidante, como mecanismo de citoprotección.

EFECTOS DE LA ROSIGLITAZONA

La rosiglitazona es una tiazolidinediona (TZD) que actúa como agonista de alta afinidad de los receptores PPAR-γ [82]. La activación de la vía de PPARγ produce, tanto en modelos animales como en humanos, una mejoría en diversos parámetros asociados con el estado de IR característico de la obesidad, la diabetes tipo 2, la hipertensión y el síndrome de ovario poliquístico [169, 170].

En nuestro modelo experimental, el tratamiento con rosiglitazona (RSG) no evitó la ganancia de peso corporal ni el incremento de los depósitos de tejido adiposo en los animales del grupo DRS. Estos resultados son similares a los obtenidos tanto en pacientes con IR como en modelos animales [171] y han sido relacionados con una mayor expresión de los receptores PPARγ en tejido adiposo. Esto concuerda con que entre los principales efectos de las TZDs se puede mencionar la promoción de la diferenciación de preadipocitos a adipocitos, la redistribución del tejido adiposo del compartimiento visceral al subcutáneo, el aumento de la captación de glucosa por el tejido adiposo y la disminución significativa de los niveles de ácidos grasos libres del plasma [95].

Por otra parte, así como se ha descripto en otros modelos animales [172, 173], la RSG disminuyó los niveles de glucosa, insulina y TG séricos, revelando una atenuación en el estado de IR inducido por la DRS. En ese sentido, el tratamiento farmacológico evitó también la alteración en la respuesta a la prueba de tolerancia a la insulina en nuestro modelo animal.

En cuanto a los efectos a nivel adrenal, nuestros resultados indicaron que el tratamiento con RSG evitó la disminución en el peso, los cambios morfológicos y la infiltración lipídica observada en las glándulas adrenales de los animales alimentados con DRS. Estos resultados podrían ser atribuidos al efecto sistémico de la droga en la reducción de la disponibilidad de ácidos grasos en circulación y por lo tanto también de la acumulación de grasa ectópica [174, 175].

Sumado a los efectos ya descriptos en la introducción sobre parámetros metabólicos e inflamatorios característicos del estado de IR, la RSG también podría ejercer un efecto directo a nivel adrenal ya que demostramos la expresión de los receptores PPARγ en la corteza adrenal, en forma análoga a lo encontrado en corteza adrenal humana normal [176], en tumores adrenocorticales y en la línea celular adrenocortical H295R. La inducción por RSG del transportador de ácidos grasos CD36, gen blanco de la activación de PPARγ, avala la funcionalidad de estos receptores en el tejido adrenal.

Dado el efecto de la actividad de la vía PPARγ sobre el metabolismo del tejido adiposo, cambios en los niveles de este receptor podrían participar de la patogénesis del síndrome metabólico. En ese sentido se ha demostrado una disminución en los niveles de PPARγ en el tejido adiposo visceral en modelos murinos de diabetes [177, 178].

En forma opuesta, en nuestro modelo experimental encontramos un incremento en los niveles de expresión de PPARγ en la corteza adrenal de los animales tratados con DRS, lo que podría asociarse con la estimulación del depósito ectópico de lípidos en el tejido adrenal. Sin embargo, los animales tratados simultáneamente con RSG mostraron una disminución en los niveles de PPARγ adrenales con respecto a los animales DRS; dado que los animales controles sometidos al tratamiento farmacológico no presentan este cambio, es probable que efectos sistémicos de la droga relacionados con la reducción de la IR contribuyan a la modificación de la expresión del receptor a nivel adrenal.

En diversos sistemas y condiciones la activación de PPARγ también se ha relacionado con efectos antiinflamatorios y antiproliferativos, así como también de arresto del ciclo celular y proapoptóticos [179]. Si bien resultados preliminares indican que el tratamiento con RSG no afectó marcadores de proliferación en el tejido adrenal (datos no mostrados), el estudio de estos efectos junto con la determinación de los mecanismos

involucrados en la inducción de PPARγ en la corteza adrenal de los animales con DRS queda aún por dilucidar.

En cuanto a la función adrenal, el tratamiento con RSG evitó el incremento en los niveles basales de corticosterona sérica y en la expresión de StAR y CYP11A1 observada en el grupo DRS. Estos efectos podrían ser secundarios a la disminución en la captación de ácidos grasos libres, a la formación de mediadores lipídicos y/o a la acumulación lipídica en la corteza adrenal. Alternativamente podrían deberse al efecto de las TZDs sobre los niveles circulantes de adipoquinas y citoquinas (aumentando los niveles de adiponectina y disminuyendo los de TNF-α) que se han observado tras la administración de RSG tanto en pacientes como en modelos animales de IR [180].

La disminución en los niveles del marcador de macrófagos F4/80, en la expresión de iNOS, COX-2, TNFα e IL-1β y en la actividad de NOS detectados a nivel adrenal resalta los efectos antiinflamatorios del fármaco que podrían también contribuir a la normalización de la esteroidogénesis adrenal. En ese sentido existen evidencias sobre el efecto inhibitorio de la RSG en la expresión de los niveles tanto de ARNm como proteicos de iNOS (en tejido adiposo) e IL1-β (en macrófagos y fibroblastos de pulmón) [181-183].

En animales controles, el tratamiento con RSG incrementó la producción de esteroides tanto en condiciones basales como luego de la estimulación por ACTH, con un aumento en los niveles de ARNm de StAR, CYP11A1 y MC2R. Estos efectos podrían resultar de la acción directa de la RSG a nivel adrenal ya que se han obtenido resultados similares en células adrenales humanas (H295R) incubadas con RSG [177]. Teniendo en cuenta estos efectos de la RSG se sugiere que en este modelo de IR predomina la estimulación de vías regulatorias alternativas (por sobre la activación de PPARγ) cuya consecuencia es una disminución en los niveles de expresión

de MC2R, como la observada en la corteza adrenal de los animales co-tratados con DRS y RSG.

EFECTOS DEL EJERCICIO MODERADO

La actividad física es uno de los pilares para el tratamiento de pacientes con *diabetes mellitus*, y, junto a las modificaciones del plan de alimentación, constituye la herramienta terapéutica fundamental para las personas que presentan obesidad, acompañada o no por el síndrome metabólico. El efecto benéfico del ejercicio sobre el control glucémico, el perfil lipídico y la insulinosensibilidad ha sido validado en numerosos estudios [184-187]. El ejercicio promueve un incremento en el gasto calórico general y una disminución en los niveles de TG séricos lo que lleva a un descenso en el peso corporal total y de los depósitos lipídicos. Se ha demostrado que bajo un régimen de ejercicio moderado el tejido muscular estriado desarrolla una serie de adaptaciones para la mejor utilización de los ácidos grasos, provenientes de hidrólisis de los TG almacenados en el tejido adiposo. En este sentido, el mayor aporte de ácidos grasos al músculo es la hidrólisis de los TG almacenados en el tejido adiposo, fundamentalmente visceral. Como consecuencia de los cambios descriptos a nivel del músculo y del tejido adiposo se produce entonces una disminución en los niveles sanguíneos de glucosa, AGL, TG, insulina y así como también de citoquinas inflamatorias lo que lleva a un incremento en la insulinosensibilidad sistémica [104, 188].

En este sentido, la implementación del régimen de ejercicio moderado en los animales alimentados con DRS evitó el aumento de peso corporal así como el de sus depósitos lipídicos. También impidió el aumento de los niveles de glucosa, insulina y TG séricos y evitó el desarrollo de IR (evaluada por medio de una prueba de tolerancia a la insulina) manteniéndose este parámetro en niveles comparables a los de los animales controles.

En cuanto al efecto del ejercicio a nivel adrenal, nuestros resultados indican que el mismo previno la disminución del peso adrenal, los cambios morfológicos de la *zona fasciculata* y la infiltración lipídica observada en

los animales "sedentarios" alimentados con DRS. Nuevamente estos efectos pueden ser consecuencia de la disminución en la disponibilidad de ácidos grasos y TG en la circulación. Con respecto a la expresión de PPARγ como factor de transcripción relacionado con el metabolismo de lípidos, nuestros resultados indican que el ejercicio evita el incremento en los niveles de PPARγ a nivel adrenal. Sin embargo, en cuanto a su gen blanco, CD36, el ejercicio incrementó sus niveles tanto en los animales controles como en los alimentados con DRS.

Es reconocido el papel del tejido muscular en el metabolismo de los combustibles como AGL y glucosa, de los cuales es un consumidor más o menos ávido dependiendo de las distintas situaciones funcionales. Sin embargo, estudios recientes indican que el músculo estriado actúa además como un tejido endócrino secretando hormonas polipeptídicas biológicamente activas y citoquinas (denominadas mioquinas) que participan de la modulación de distintos procesos, entre ellos metabólicos e inflamatorios, en tejidos no musculares [189]. En particular, Seldin et al han demostrado que la mionectina (CTRP15), cuya producción en el músculo es incrementada por el ejercicio, aumenta la captación de ácidos grasos en adipocitos y hepatocitos induciendo la expresión de genes involucrados en estos mecanismos (como CD36, FABP, etc) [190]. Este mecanismo podría explicar, al menos en parte algunos efectos del ejercicio en la regulación sistémica del metabolismo en tejidos diferentes al músculo esquelético. En particular, los efectos de esta mioquina (u otras similares) podrían explicar el incremento en los niveles de CD36 observado en la corteza adrenal de los animales sometidos al protocolo de ejercicio. Resta por analizar la función de CD36 en el tejido adrenal, ya que no se observa una infiltración lipídica significativa en los animales tratados con DRS y ejercicio. En ese sentido también se ha propuesto a CD36 como parte de la familia de receptores *scavenger* de LDL oxidadas y de productos avanzados de la glicosilación entre otros [191-193].

Los efectos del ejercicio sobre el peso, la estructura y los depósitos lipídicos adrenales correlacionaron con la disminución en los niveles de expresión de StAR y CYP11A1 y de corticosterona sérica hacia valores homólogos a los de los controles. Los animales sometidos al protocolo de ejercicio (grupos E y DRS + E) mostraron además niveles de expresión de MC2R y una respuesta a la estimulación aguda con ACTH similares a la de los animales del grupo control sedentario. En ese sentido, Campbell *et al*. propusieron que el ejercicio desencadena una serie de adaptaciones de la glándula adrenal generando una etapa transitoria de hipersensibilidad (primeras 2 semanas) donde se incrementan los niveles basales de corticosterona y la respuesta a la ACTH exógena en forma simultánea con un aumento en los niveles del receptor de ACTH MC2R y de la proteína StAR. Sin embargo, a largo plazo (8 semanas) estas diferencias se atenúan y no hay cambios en los parámetros mencionados con respecto a los animales del grupo sedentario [194]. En base a estas evidencias, se sugiere que la prevención por el ejercicio del efecto de la DRS sobre la función adrenal, se debe principalmente a efectos sistémicos asociados al mismo.

En este sentido, se ha demostrado que el ejercicio moderado induce una disminución en los niveles circulantes de cortisol y una atenuación general del estado inflamatorio [195, 196] y que disminuye los niveles sanguíneos de ácidos grasos libres y de mediadores inflamatorios como TNF-α, IL-6, etc.[197, 198]. En nuestro modelo experimental encontramos que el ejercicio también modifica el perfil inflamatorio y antioxidante adrenal. En particular, observamos que el ejercicio evitó tanto el aumento en los niveles de COX-2, HO-1 e iNOS como en la actividad total de NOS y produjo un descenso en los niveles de expresión de F4/80, de TNF-α y de IL-1β a nivel adrenal. Dado que estos sistemas/mediadores también modulan la esteroidogénesis adrenal, el ejercicio también podría regular la producción de glucocorticoides a través de este mecanismo.

En conclusión, el régimen de ejercicio moderado previno los cambios morfológicos y funcionales de la corteza adrenal en los animales alimentados con DRS. Esto podría ser consecuencia de la normalización de parámetros bioquímicos sanguíneos relacionados con la IR (glucemia, trigliceridemia, insulinemia, aumento en AGL y citoquinas proinflamatorias) pero también de la generación de mediadores hormonales por el tejido muscular [189].

Conclusiones generales

Conclusiones generales

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la administración a ratas de sacarosa al 30% en el agua de bebida genera en forma temprana (ya a las tres semanas) un estado de insulinorresistencia (IR) sistémico, que fue confirmado por la deficiente respuesta a la administración de insulina, luego de siete semanas de tratamiento. Dados el incremento en el contenido calórico de la ingesta de estos animales y la elevada proporción de carbohidratos simples, estos animales muestran, en forma paralela al desarrollo de la IR, un incremento en el peso corporal y de los depósitos lipídicos y en los parámetros bioquímicos asociados (glucemia, insulinemia, trigliceridemia y niveles de colesterol- no HDL).

Se ha sugerido que alteraciones en la secreción y/o acción de los glucocorticoides podrían contribuir a los cambios somáticos y bioquímicos observados en pacientes y en modelos animales de IR. En ese sentido el objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar morfología y función adrenocorticales en el modelo de IR inducida por una dieta rica en sacarosa (DRS).

De acuerdo a nuestros resultados los animales con IR muestran una disminución significativa en el tamaño y el peso de sus glándulas adrenales, una desorganización en la disposición de las células esteroidogénicas de la *zona fasciculata* y un incremento del tamaño y número de gotas lipídicas en el tejido (acumulación de triglicéridos). Postulamos que dicha infiltración lipídica podría deberse a que ante la mayor oferta de ácidos grasos que acompaña al estado de IR, se produciría un desbalance entre los mecanismos de captación y de utilización de los ácidos grasos que llevarían a un incremento del depósito de triglicéridos y a la generación de mediadores lipídicos citotóxicos que pueden promover la apoptosis celular. Este mecanismo podría explicar, al menos en parte, los cambios morfológicos observados en las glándulas adrenales de los animales con IR. Por otra parte, la generación de mediadores lipídicos

también podría desencadenar un cuadro inflamatorio local con incremento de la expresión de iNOS y COX-2 (posiblemente vía estimulación de NFκB) mientras que el aumento del aporte de combustibles podría generar estrés oxidativo, con la consiguiente inducción de los sistemas de citoprotección, como el de la HO-1.

Por otro lado, sugerimos que estos cambios locales, en conjunción con el incremento de adipoquinas, citoquinas u hormonas circulantes influyen significativamente sobre la esteroidogénesis adrenal (expresión de proteínas como StAR y CYP11A1) y la secreción basal de corticosterona. A su vez, niveles basales incrementados de glucocorticoides exacerbarían la IR sistémica, generando un circuito reverberante cuyos efectos deletéreos podrían llevar al desarrollo de patologías como, por ejemplo, la *diabetes mellitus* tipo 2. El daño tisular inducido por los mecanismos descriptos y/o la disminución de la expresión de los receptores MC2R serían responsables de la respuesta insuficiente ante el estímulo hormonal suprafisiológico realizado con ACTH exógena

Finalmente estudiamos el efecto de dos tratamientos insulinosensibilizadores reconocidos: la administración de rosiglitazona (una tiazolidinediona) y el entrenamiento con un régimen de ejercicio moderado. En ambos casos, la intervención, que fue aplicada en forma simultánea con la modificación de la dieta, previno los cambios morfológicos y funcionales observados a nivel adrenal en los animales que recibieron la DRS.

Los resultados obtenidos tras la aplicación de estos tratamientos insulinosensibilizadores con distinto mecanismo de acción apoyan, por un lado la existencia de una relación causal entre el desarrollo de insulinorresitencia y la aparición de cambios morfofuncionales a nivel de la corteza adrenal de los animales sometidos a la manipulación dietaria. Por otro lado, mediante la normalización de los niveles de distintos metabolitos y mediadores circulantes, y también posiblemente por efectos directos a nivel adrenal, la insulinosensibilización lograda ya sea mediante

un método farmacológico o bien a través del incremento de la actividad física evita la generación de una hipercosticosteronemia basal crónica y sus efectos deletéreos asociados, y permite asimismo, la conservación de la respuesta fisiológica al estrés.

En suma, la ingesta de una dieta rica en sacarosa induce el establecimiento de un estado de IR sistémico que coexiste con cambios morfológicos en la corteza adrenal y con niveles basales elevados de glucocorticoides circulantes. Si bien los experimentos realizados no permiten establecer si la generación de IR precede a la disfunción adrenal, la respuesta al tratamiento insulinosensibilizador, y sobre todo al incremento de la actividad física, sugiere fuertemente la existencia de una relación causal entre ambos fenómenos. En cualquier caso, se concluye que la IR en estos animales cursa con hipercorticosteronemia basal, lo que posiblemente acentúe el cuadro de IR sistémica, contribuyendo al desarrollo de alteraciones cardiovasculares (hipertensión) y metabólicas (*diabetes mellitus* tipo 2), entre otras. Teniendo esto en cuenta, es evidente que la prevención de la IR debería ser un objetivo médico principal en las sociedades modernas, tanto desde el punto de vista sanitario como económico. En ese sentido, los resultados presentados en esta tesis demuestran que la alimentación rica en carbohidratos simples, un componente de uso creciente en la dieta occidental, genera IR y cambios morfofuncionales en la corteza adrenal, mientras que el ejercicio físico moderado, una estrategia terapéutica efectiva para el cuidado de la salud en general, mitiga tanto las alteraciones metabólicas como corticoadrenales ligadas a la IR.

Referencias bibliográficas

BIBLIOGRAFIA

1. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.* Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
2. Reaven, G.M. and Y.D. Chen, *Role of abnormal free fatty acid metabolism in the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus.* Am J Med, 1988. **85**(5A): p. 106-12.
3. Ford, E.S., W.H. Giles, and W.H. Dietz, *Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey.* Jama, 2002. **287**(3): p. 356-9.
4. Friedman, J.M., *Obesity in the new millennium.* Nature, 2000. **404**(6778): p. 632-4.
5. Daly, M.E., et al., *Dietary carbohydrates and insulin sensitivity: a review of the evidence and clinical implications.* Am J Clin Nutr, 1997. **66**(5): p. 1072-85.
6. Kashyap, S.R., et al., *Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patients.* Diabetes Care, 2008. **31**(1): p. 134-9.
7. DeFronzo, R.A., *Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009.* Diabetologia, 2010. **53**(7): p. 1270-87.
8. Boden, G., *Fatty acids and insulin resistance.* Diabetes Care, 1996. **19**(4): p. 394-5.
9. Krssak, M., et al., *Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a 1H NMR spectroscopy study.* Diabetologia, 1999. **42**(1): p. 113-6.
10. Samuel, V.T. and G.I. Shulman, *Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links.* Cell. **148**(5): p. 852-71.
11. Dandona, P., A. Chaudhuri, and A. Aljada, *Endothelial dysfunction and hypertension in diabetes mellitus.* Med Clin North Am, 2004. **88**(4): p. 911-31, x-xi.

12. Fantuzzi, G., *Adipose tissue, adipokines, and inflammation.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(5): p. 911-9; quiz 920.
13. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.* Nature, 2006. **444**(7121): p. 840-6.
14. Evans, A.J. and A.J. Krentz, *Insulin resistance and beta-cell dysfunction as therapeutic targets in type 2 diabetes.* Diabetes Obes Metab, 2001. **3**(4): p. 219-29.
15. Evans, J.L., B.A. Maddux, and I.D. Goldfine, *The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance.* Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(7-8): p. 1040-52.
16. Machann, J., et al., *Intramyocellular lipids and insulin resistance.* Diabetes Obes Metab, 2004. **6**(4): p. 239-48.
17. Dresner, A., et al., *Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity.* J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 253-9.
18. Koutsari, C. and M.D. Jensen, *Thematic review series: patient-oriented research. Free fatty acid metabolism in human obesity.* J Lipid Res, 2006. **47**(8): p. 1643-50.
19. Chawla, A., et al., *PPARdelta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 1268-73.
20. Edvardsson, U., A. Ljungberg, and J. Oscarsson, *Insulin and oleic acid increase PPARgamma2 expression in cultured mouse hepatocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **340**(1): p. 111-7.
21. Matsusue, K., et al., *Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27.* Cell Metab, 2008. **7**(4): p. 302-11.
22. Listenberger, L.L., et al., *Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3077-82.
23. Duncan, R.E., et al., *Regulation of lipolysis in adipocytes.* Annu Rev Nutr, 2007. **27**: p. 79-101.

24. Coppack, S.W., M.D. Jensen, and J.M. Miles, *In vivo regulation of lipolysis in humans.* J Lipid Res, 1994. **35**(2): p. 177-93.
25. Kosteli, A., et al., *Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue.* J Clin Invest. **120**(10): p. 3466-79.
26. Greenberg, A.S., et al., *The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans.* J Clin Invest. **121**(6): p. 2102-10.
27. Doggrell, S.A. and L. Brown, *Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure.* Cardiovasc Res, 1998. **39**(1): p. 89-105.
28. Speakman, J., et al., *Animal models of obesity.* Obes Rev, 2007. **8 Suppl 1**: p. 55-61.
29. Massiera, F., et al., *A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations.* J Lipid Res. **51**(8): p. 2352-61.
30. Panchal, S.K., et al., *High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats.* J Cardiovasc Pharmacol. **57**(5): p. 611-24.
31. Pagliassotti, M.J. and P.A. Prach, *Quantity of sucrose alters the tissue pattern and time course of insulin resistance in young rats.* Am J Physiol, 1995. **269**(3 Pt 2): p. R641-6.
32. Delbosc, S., et al., *Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat.* Atherosclerosis, 2005. **179**(1): p. 43-9.
33. Dekker, M.J., et al., *Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome.* Am J Physiol Endocrinol Metab. **299**(5): p. E685-94.
34. Oliva, M.E., et al., *Soya protein ameliorates the metabolic abnormalities of dysfunctional adipose tissue of dyslipidaemic rats fed a sucrose-rich diet.* Br J Nutr. **105**(8): p. 1188-98.
35. Huang, W., et al., *Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance.* Diabetes. **59**(2): p. 347-57.

36. Cushing, H., *The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism)". Bulletin of the Johns Hopkins Hospital.* Bulletin of the Johns Hopkins Hospital, 1932. **50**(4): p. 137-95.
37. Stocco, D.M., *StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis.* Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 193-213.
38. Vedder, H., et al., *Dose-dependence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) effects on peak response and time course of the immune-endocrine host response in humans.* Inflamm Res, 1999. **48**(2): p. 67-74.
39. Stenzel-Poore, M., W.W. Vale, and C. Rivier, *Relationship between antigen-induced immune stimulation and activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat.* Endocrinology, 1993. **132**(3): p. 1313-8.
40. Romero, D.G., et al., *Interleukin-8 synthesis, regulation, and steroidogenic role in H295R human adrenocortical cells.* Endocrinology, 2006. **147**(2): p. 891-8.
41. Rotondi, M., et al., *Elevated serum interferon-gamma-inducible chemokine-10/CXC chemokine ligand-10 in autoimmune primary adrenal insufficiency and in vitro expression in human adrenal cells primary cultures after stimulation with proinflammatory cytokines.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(4): p. 2357-63.
42. Cymeryng, C.B., et al., *Induction of nitric oxide synthase activity in adrenal cells.* Endocr Res, 2000. **26**(4): p. 589-95.
43. Cymeryng, C.B., et al., *Expression of nitric oxide synthases in rat adrenal zona fasciculata cells.* Endocrinology, 2002. **143**(4): p. 1235-42.
44. Alexandreanu, I.C. and D.M. Lawson, *Heme oxygenase in the rat ovary: immunohistochemical localization and possible role in steroidogenesis.* Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(1): p. 59-63.
45. Grion, N., et al., *Induction of nitric oxide synthase and heme oxygenase activities by endotoxin in the rat adrenal cortex: involvement of both signaling systems in the modulation of ACTH-dependent steroid production.* J Endocrinol, 2007. **194**(1): p. 11-20.

46. Mohn, C.E., et al., *The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E2.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(17): p. 6213-8.
47. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.* Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
48. Cymeryng, C.B., et al., *Effects of L-arginine in rat adrenal cells: involvement of nitric oxide synthase.* Endocrinology, 1999. **140**(7): p. 2962-7.
49. Van Voorhis, B.J., et al., *Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis.* Endocrinology, 1994. **135**(5): p. 1799-806.
50. Del Punta, K., E.H. Charreau, and O.P. Pignataro, *Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis.* Endocrinology, 1996. **137**(12): p. 5337-43.
51. Moncada, S., et al., *An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.* Nature, 1976. **263**(5579): p. 663-5.
52. Whittle, B.J., et al., *Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa.* Nature, 1980. **284**(5753): p. 271-3.
53. Maier, R.V., G.B. Hahnel, and T.H. Pohlman, *Endotoxin requirements for alveolar macrophage stimulation.* J Trauma, 1990. **30**(12 Suppl): p. S49-57.
54. Chandrasekharan, N.V., et al., *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13926-31.
55. Martinez Calejman, C., et al., *Lipopolysaccharide stimulates adrenal steroidogenesis in rodent cells by a NFkappaB-dependent mechanism involving COX-2 activation.* Mol Cell Endocrinol. **337**(1-2): p. 1-6.
56. Maines, M.D., G.M. Trakshel, and R.K. Kutty, *Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible.* J Biol Chem, 1986. **261**(1): p. 411-9.

57. Trakshel, G.M. and M.D. Maines, *Multiplicity of heme oxygenase isozymes. HO-1 and HO-2 are different molecular species in rat and rabbit.* J Biol Chem, 1989. **264**(2): p. 1323-8.
58. Maines, M.D., J.A. Mark, and J.F. Ewing, *Heme Oxygenase, a Likely Regulator of cGMP Production in the Brain: Induction in Vivo of HO-1 Compensates for Depression in NO Synthase Activity.* Mol Cell Neurosci, 1993. **4**(5): p. 396-405.
59. Maines, M.D. and J.F. Ewing, *Stress response of the rat testis: in situ hydridization and immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 (HSP32) induction by hyperthermia.* Biol Reprod, 1996. **54**(5): p. 1070-9.
60. Terry, C.M., et al., *Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells.* Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. H883-91.
61. Yet, S.F., et al., *Induction of heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cells. A link to endotoxic shock.* J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4295-301.
62. Poss, K.D. and S. Tonegawa, *Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10925-30.
63. Yachie, A., et al., *Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency.* J Clin Invest, 1999. **103**(1): p. 129-35.
64. Pomeraniec, Y., et al., *Adrenocorticotropin induces heme oxygenase-1 expression in adrenal cells.* J Endocrinol, 2004. **180**(1): p. 113-24.
65. Nosadini, R., et al., *Insulin resistance in Cushing's syndrome.* J Clin Endocrinol Metab, 1983. **57**(3): p. 529-36.
66. Rizza, R.A., L.J. Mandarino, and J.E. Gerich, *Cortisol-induced insulin resistance in man: impaired suppression of glucose production and stimulation of glucose utilization due to a postreceptor detect of insulin action.* J Clin Endocrinol Metab, 1982. **54**(1): p. 131-8.

67. Bjorntorp, P. and R. Rosmond, *Perturbations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the metabolic syndrome in ageing.* Growth Horm IGF Res, 1999. **9 Suppl A**: p. 121-3.
68. Kaufman, D., et al., *Early-life stress and the development of obesity and insulin resistance in juvenile bonnet macaques.* Diabetes, 2007. **56**(5): p. 1382-6.
69. Shively, C. and J. Kaplan, *Effects of social factors on adrenal weight and related physiology of Macaca fascicularis.* Physiol Behav, 1984. **33**(5): p. 777-82.
70. Plotsky, P.M., et al., *Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the Zucker obese rat.* Endocrinology, 1992. **130**(4): p. 1931-41.
71. Pasquali, R., et al., *The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in obese women with different patterns of body fat distribution.* J Clin Endocrinol Metab, 1993. **77**(2): p. 341-6.
72. Kusunoki, M., et al., *Amelioration of high-fat feeding-induced insulin resistance in skeletal muscle with the antiglucocorticoid RU486.* Diabetes, 1995. **44**(6): p. 718-20.
73. Voutilainen, R., *Adrenocortical cells are the site of secretion and action of insulin-like growth factors and TNF-alpha.* Horm Metab Res, 1998. **30**(6-7): p. 432-5.
74. Malendowicz, L.K., et al., *Effects of leptin and leptin fragments on steroid secretion of freshly dispersed rat adrenocortical cells.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **87**(4-5): p. 265-8.
75. Grekin, R.J., A.P. Vollmer, and R.S. Sider, *Pressor effects of portal venous oleate infusion. A proposed mechanism for obesity hypertension.* Hypertension, 1995. **26**(1): p. 193-8.
76. Widmaier, E.P., J. Margenthaler, and I. Sarel, *Regulation of pituitary-adrenocortical activity by free fatty acids in vivo and in vitro.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1995. **52**(2-3): p. 179-83.
77. Chan, O., et al., *Hyperglycemia does not increase basal hypothalamo-pituitary-adrenal activity in diabetes but it does impair the HPA response to*

insulin-induced hypoglycemia. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **289**(1): p. R235-46.

78. Kristiansen, S.B., et al., *Induction of steroidogenic enzyme genes by insulin and IGF-I in cultured adult human adrenocortical cells.* Steroids, 1997. **62**(2): p. 258-65.
79. Olefsky, J.M. and A.R. Saltiel, *PPAR gamma and the treatment of insulin resistance.* Trends Endocrinol Metab, 2000. **11**(9): p. 362-8.
80. Michalik, L., B. Desvergne, and W. Wahli, *Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 61-70.
81. Willson, T.M., et al., *The PPARs: from orphan receptors to drug discovery.* J Med Chem, 2000. **43**(4): p. 527-50.
82. Lehmann, J.M., et al., *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma).* J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 12953-6.
83. Saltiel, A.R. and J.M. Olefsky, *Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes.* Diabetes, 1996. **45**(12): p. 1661-9.
84. Ribon, V., et al., *Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferatoractivated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14751-6.
85. Kreutter, D.K., et al., *Insulinlike activity of new antidiabetic agent CP 68722 in 3T3-L1 adipocytes.* Diabetes, 1990. **39**(11): p. 1414-9.
86. Wu, Z., et al., *PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes.* J Clin Invest, 1998. **101**(1): p. 22-32.
87. Wu, C.W., et al., *PPARgamma is essential for protection against nonalcoholic steatohepatitis.* Gene Ther. **17**(6): p. 790-8.
88. Okuno, A., et al., *Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats.* J Clin Invest, 1998. **101**(6): p. 1354-61.

89. Adams, M., et al., *Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation.* J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 3149-53.
90. Kruszynska, Y.T., et al., *Skeletal muscle peroxisome proliferator- activated receptor-gamma expression in obesity and non- insulin-dependent diabetes mellitus.* J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 543-8.
91. Brunzell, J.D. and J.E. Hokanson, *Dyslipidemia of central obesity and insulin resistance.* Diabetes Care, 1999. **22 Suppl 3**: p. C10-3.
92. Stern, R.H. and R.B. Abel, *Rate of low-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B changes on initiation and discontinuation of atorvastatin treatment.* J Clin Pharmacol, 1997. **37**(4): p. 291-6.
93. Festa, A., et al., *LDL particle size in relation to insulin, proinsulin, and insulin sensitivity. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study.* Diabetes Care, 1999. **22**(10): p. 1688-93.
94. Fonseca, V., et al., *Effect of metformin and rosiglitazone combination therapy in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial.* Jama, 2000. **283**(13): p. 1695-702.
95. Lebovitz, H.E., *Oral therapies for diabetic hyperglycemia.* Endocrinol Metab Clin North Am, 2001. **30**(4): p. 909-33.
96. Kadiiska, M.B., et al., *Thiazolidinedione treatment decreases oxidative stress in spontaneously hypertensive heart failure rats through attenuation of inducible nitric oxide synthase-mediated lipid radical formation.* Diabetes. **61**(3): p. 586-96.
97. Chung, S.S., et al., *Glutathione peroxidase 3 mediates the antioxidant effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human skeletal muscle cells.* Mol Cell Biol, 2009. **29**(1): p. 20-30.
98. Pini, M., et al., *Rosiglitazone improves survival and hastens recovery from pancreatic inflammation in obese mice.* PLoS One. **7**(7): p. e40944.
99. Nguyen, M.T., et al., *Regulation of chemokine and chemokine receptor expression by PPARgamma in adipocytes and macrophages.* PLoS One. **7**(4): p. e34976.

100. Foryst-Ludwig, A., et al., *PPARgamma activation attenuates T-lymphocyte-dependent inflammation of adipose tissue and development of insulin resistance in obese mice.* Cardiovasc Diabetol, 2010. **9**: p. 64.
101. Zanuso, S., S. Balducci, and A. Jimenez, *Physical activity, a key factor to quality of life in type 2 diabetic patients.* Diabetes Metab Res Rev, 2009. **25 Suppl 1**: p. S24-8.
102. Wojtaszewski, J.F., et al., *Insulin signalling: effects of prior exercise.* Acta Physiol Scand, 2003. **178**(4): p. 321-8.
103. Yates, T., et al., *The role of physical activity in the management of impaired glucose tolerance: a systematic review.* Diabetologia, 2007. **50**(6): p. 1116-26.
104. Richter, E.A., et al., *Muscle glucose metabolism following exercise in the rat: increased sensitivity to insulin.* J Clin Invest, 1982. **69**(4): p. 785-93.
105. Richter, E.A., et al., *Enhanced muscle glucose metabolism after exercise: modulation by local factors.* Am J Physiol, 1984. **246**(6 Pt 1): p. E476-82.
106. Hansen, P.A., et al., *Increased GLUT-4 translocation mediates enhanced insulin sensitivity of muscle glucose transport after exercise.* J Appl Physiol, 1998. **85**(4): p. 1218-22.
107. Frosig, C., et al., *Exercise improves phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate responsiveness of atypical protein kinase C and interacts with insulin signalling to peptide elongation in human skeletal muscle.* J Physiol, 2007. **582**(Pt 3): p. 1289-301.
108. Wojtaszewski, J.F., et al., *Insulin signaling and insulin sensitivity after exercise in human skeletal muscle.* Diabetes, 2000. **49**(3): p. 325-31.
109. Wilson, C., M. Hargreaves, and K.F. Howlett, *Exercise does not alter subcellular localization, but increases phosphorylation of insulin-signaling proteins in human skeletal muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(2): p. E341-6.
110. Ishiki, M., et al., *Insulin regulates the membrane arrival, fusion, and C-terminal unmasking of glucose transporter-4 via distinct phosphoinositides.* J Biol Chem, 2005. **280**(31): p. 28792-802.

111. Farese, R.V., M.P. Sajan, and M.L. Standaert, *Atypical protein kinase C in insulin action and insulin resistance.* Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 2): p. 350-3.
112. Kramer, H.F., et al., *AS160 regulates insulin- and contraction-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle.* J Biol Chem, 2006. **281**(42): p. 31478-85.
113. Treebak, J.T., et al., *AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits.* Diabetes, 2006. **55**(7): p. 2051-8.
114. Arias, E.B., et al., *Prior exercise increases phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(4): p. E1191-200.
115. Dugani, C.B. and A. Klip, *Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies.* EMBO Rep, 2005. **6**(12): p. 1137-42.
116. Beeson, M., et al., *Activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)3 is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise.* Diabetes, 2003. **52**(8): p. 1926-34.
117. Haystead, T.A., et al., *Roles of the AMP-activated and cyclic-AMP-dependent protein kinases in the adrenaline-induced inactivation of acetyl-CoA carboxylase in rat adipocytes.* Eur J Biochem, 1990. **187**(1): p. 199-205.
118. Moule, S.K. and R.M. Denton, *The activation of p38 MAPK by the beta-adrenergic agonist isoproterenol in rat epididymal fat cells.* FEBS Lett, 1998. **439**(3): p. 287-90.
119. Daval, M., et al., *Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes.* J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 25250-7.
120. Kelly, M., et al., *AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **320**(2): p. 449-54.

121. Assifi, M.M., et al., *AMP-activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **289**(5): p. E794-800.
122. Park, D.H. and J.W. Ransone, *Effects of submaximal exercise on high-density lipoprotein-cholesterol subfractions.* Int J Sports Med, 2003. **24**(4): p. 245-51.
123. Scomparin, D.X., et al., *Low-Intensity swimming training after weaning improves glucose and lipid homeostasis in MSG hypothalamic obese mice.* Endocr Res. **36**(2): p. 83-90.
124. Niess, A.M., et al., *Expression of the antioxidant stress protein heme oxygenase-1 (HO-1) in human leukocytes.* Free Radic Biol Med, 1999. **26**(1-2): p. 184-92.
125. Bai, Y., et al., *Effect of exercise on cardiac tissue oxidative and inflammatory mediators in chronic kidney disease.* Am J Nephrol, 2009. **29**(3): p. 213-21.
126. Jenkins, N.T., et al., *Effects of acute and chronic endurance exercise on intracellular nitric oxide and superoxide in circulating CD34(+) and CD34(-) cells.* J Appl Physiol. **111**(3): p. 929-37.
127. Harms, P.G. and S.R. Ojeda, *A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein.* J Appl Physiol, 1974. **36**(3): p. 391-2.
128. Cymeryng, C.B., L.A. Dada, and E.J. Podesta, *Effect of nitric oxide on rat adrenal zona fasciculata steroidogenesis.* J Endocrinol, 1998. **158**(2): p. 197-203.
129. Zago, V., et al., *Circulating very-low-density lipoprotein characteristics resulting from fatty liver in an insulin resistance rat model.* Ann Nutr Metab. **56**(3): p. 198-206.
130. Fortino, M.A., Y.B. Lombardo, and A. Chicco, *The reduction of dietary sucrose improves dyslipidemia, adiposity, and insulin secretion in an insulin-resistant rat model.* Nutrition, 2007. **23**(6): p. 489-97.

131. Lombardo, Y.B., G. Hein, and A. Chicco, *Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity.* Lipids, 2007. **42**(5): p. 427-37.
132. Parks, E.J. and M.K. Hellerstein, *Carbohydrate-induced hypertriacylglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanisms.* Am J Clin Nutr, 2000. **71**(2): p. 412-33.
133. Ryu, M.H. and Y.S. Cha, *The effects of a high-fat or high-sucrose diet on serum lipid profiles, hepatic acyl-CoA synthetase, carnitine palmitoyltransferase-I, and the acetyl-CoA carboxylase mRNA levels in rats.* J Biochem Mol Biol, 2003. **36**(3): p. 312-8.
134. Lindqvist, A., A. Baelemans, and C. Erlanson-Albertsson, *Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals.* Regul Pept, 2008. **150**(1-3): p. 26-32.
135. Ruzzin, J., Y.C. Lai, and J. Jensen, *Consumption of carbohydrate solutions enhances energy intake without increased body weight and impaired insulin action in rat skeletal muscles.* Diabetes Metab, 2005. **31**(2): p. 178-88.
136. Wright, D.W., et al., *Sucrose-induced insulin resistance in the rat: modulation by exercise and diet.* Am J Clin Nutr, 1983. **38**(6): p. 879-83.
137. Gutman, R.A., et al., *Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose-rich diet.* Metabolism, 1987. **36**(11): p. 1013-20.
138. Budohoski, L., et al., *Reversal of dietary-induced insulin resistance in muscle of the rat by adenosine deaminase and an adenosine-receptor antagonist.* Biochem J, 1984. **224**(1): p. 327-30.
139. Walker, B.R. and R. Andrew, *Tissue production of cortisol by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and metabolic disease.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1083**: p. 165-84.
140. Ball, R.A., et al., *Glucocorticoid induced stress susceptibility in swine: adrenocortical pathology.* Can J Comp Med, 1974. **38**(2): p. 153-9.

141. Lara-Castro, C. and W.T. Garvey, *Intracellular lipid accumulation in liver and muscle and the insulin resistance syndrome.* Endocrinol Metab Clin North Am, 2008. **37**(4): p. 841-56.
142. Chicco, A., et al., *Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet.* J Nutr, 2003. **133**(1): p. 127-33.
143. Consitt, L.A., J.A. Bell, and J.A. Houmard, *Intramuscular lipid metabolism, insulin action, and obesity.* IUBMB Life, 2009. **61**(1): p. 47-55.
144. Guan, Y. and M.D. Breyer, *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease.* Kidney Int, 2001. **60**(1): p. 14-30.
145. Mei, M., et al., *Inflammatory stress exacerbates ectopic lipid deposition in C57BL/6J mice.* Lipids Health Dis. **10**: p. 110.
146. Buchenauer, T., et al., *Diet-induced obesity alters behavior as well as serum levels of corticosterone in F344 rats.* Physiol Behav, 2009. **98**(5): p. 563-9.
147. Cano, P., et al., *Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats.* Endocrine, 2008. **33**(2): p. 118-25.
148. Masuzaki, H., et al., *A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome.* Science, 2001. **294**(5549): p. 2166-70.
149. Masuzaki, H. and J.S. Flier, *Tissue-specific glucocorticoid reactivating enzyme, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 beta-HSD1)--a promising drug target for the treatment of metabolic syndrome.* Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2003. **3**(4): p. 255-62.
150. Paterson, J.M., et al., *Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(18): p. 7088-93.
151. Kotelevtsev, Y., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and*

resist hyperglycemia on obesity or stress. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14924-9.

152. Jessop, D.S., et al., *Resistance to glucocorticoid feedback in obesity.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(9): p. 4109-14.
153. Grayson, B.E., et al., *Changes in melanocortin expression and inflammatory pathways in fetal offspring of nonhuman primates fed a high-fat diet.* Endocrinology. **151**(4): p. 1622-32.
154. Miller, W.L., *Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis.* J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. **55**(5-6): p. 607-16.
155. Strauss, J.F., 3rd, et al., *The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): a window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking.* Recent Prog Horm Res, 1999. **54**: p. 369-94; discussion 394-5.
156. Manna, P.R., M.T. Dyson, and D.M. Stocco, *Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives.* Mol Hum Reprod, 2009. **15**(6): p. 321-33.
157. Rabano, M., et al., *Sphingosine-1-phosphate stimulates cortisol secretion.* FEBS Lett, 2003. **535**(1-3): p. 101-5.
158. Sarel, I. and E.P. Widmaier, *Stimulation of steroidogenesis in cultured rat adrenocortical cells by unsaturated fatty acids.* Am J Physiol, 1995. **268**(6 Pt 2): p. R1484-90.
159. Lambert-Langlais, S., et al., *Aldo keto reductase 1B7 and prostaglandin F2alpha are regulators of adrenal endocrine functions.* PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7309.
160. Engstrom, L., et al., *Systemic immune challenge activates an intrinsically regulated local inflammatory circuit in the adrenal gland.* Endocrinology, 2008. **149**(4): p. 1436-50.
161. Bornstein, S.R., H. Rutkowski, and I. Vrezas, *Cytokines and steroidogenesis.* Mol Cell Endocrinol, 2004. **215**(1-2): p. 135-41.
162. Mikhaylova, I.V., et al., *Tumor necrosis factor-alpha regulates steroidogenesis, apoptosis, and cell viability in the human adrenocortical cell line NCI-H295R.* Endocrinology, 2007. **148**(1): p. 386-92.

163. Michl, P., et al., *Interleukin-3 and interleukin-6 stimulate bovine adrenal cortisol secretion through different pathways.* J Neuroendocrinol, 2000. **12**(1): p. 23-8.
164. Ehrhart-Bornstein, M., et al., *Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 14211-6.
165. Kadowaki, T., et al., *Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome.* J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1784-92.
166. Li, P., et al., *Expression of adiponectin receptors in mouse adrenal glands and the adrenocortical Y-1 cell line: adiponectin regulates steroidogenesis.* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **390**(4): p. 1208-13.
167. Paschke, L., et al., *Adiponectin and adiponectin receptor system in the rat adrenal gland: ontogenetic and physiologic regulation, and its involvement in regulating adrenocortical growth and steroidogenesis.* Peptides. **31**(9): p. 1715-24.
168. Romeo, G.R., J. Lee, and S.E. Shoelson, *Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation--mechanisms and therapeutic targets.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. **32**(8): p. 1771-6.
169. Radosh, L., *Drug treatments for polycystic ovary syndrome.* Am Fam Physician, 2009. **79**(8): p. 671-6.
170. Potenza, M.A., et al., *Treatment of spontaneously hypertensive rats with rosiglitazone and/or enalapril restores balance between vasodilator and vasoconstrictor actions of insulin with simultaneous improvement in hypertension and insulin resistance.* Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3594-603.
171. Kahn, B.B. and T.E. McGraw, *Rosiglitazone, PPARgamma, and type 2 diabetes.* N Engl J Med. **363**(27): p. 2667-9.
172. Jiang, G., et al., *Potentiation of insulin signaling in tissues of Zucker obese rats after acute and long-term treatment with PPARgamma agonists.* Diabetes, 2002. **51**(8): p. 2412-9.

173. Sharabi, Y., et al., *Effect of PPAR-gamma agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model.* Am J Hypertens, 2007. **20**(2): p. 206-10.
174. Yki-Jarvinen, H., *Thiazolidinediones.* N Engl J Med, 2004. **351**(11): p. 1106-18.
175. Oakes, N.D., et al., *Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability.* Diabetes, 2001. **50**(5): p. 1158-65.
176. Uruno, A., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-{gamma} suppresses CYP11B2 expression and aldosterone production.* J Mol Endocrinol. **46**(1): p. 37-49.
177. Betz, M.J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists suppress adrenocortical tumor cell proliferation and induce differentiation.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(7): p. 3886-96.
178. Fujiki, K., et al., *Expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes.* BMC Biol, 2009. **7**: p. 38.
179. Hamblin, M., et al., *PPARs and the cardiovascular system.* Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(6): p. 1415-52.
180. Miyazaki, Y. and R.A. DeFronzo, *Rosiglitazone and pioglitazone similarly improve insulin sensitivity and secretion, glucose tolerance and adipocytokines in type 2 diabetic patients.* Diabetes Obes Metab, 2008. **10**(12): p. 1204-11.
181. Dallaire, P., et al., *Obese mice lacking inducible nitric oxide synthase are sensitized to the metabolic actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonism.* Diabetes, 2008. **57**(8): p. 1999-2011.
182. Hogan, C.M., et al., *Electrophilic PPARgamma Ligands Attenuate IL-1beta and Silica-Induced Inflammatory Mediator Production in Human Lung Fibroblasts via a PPARgamma-Independent Mechanism.* PPAR Res. **2011**: p. 318134.

183. Faine, L.A., et al., *Anti-inflammatory and antioxidant properties of a new arylidene-thiazolidinedione in macrophages.* Curr Med Chem. **18**(22): p. 3351-60.
184. Colberg, S.R., *Physical activity: the forgotten tool for type 2 diabetes management.* Front Endocrinol (Lausanne). **3**: p. 70.
185. Sato, K., et al., *DHEA administration and exercise training improves insulin resistance in obese rats.* Nutr Metab (Lond). **9**(1): p. 47.
186. Boersma, G.J., et al., *Forced and voluntary exercise counteract insulin resistance in rats: The role of coping style.* Horm Behav. **62**(1): p. 93-8.
187. Escalante, Y., et al., *Improvement of the lipid profile with exercise in obese children: a systematic review.* Prev Med. **54**(5): p. 293-301.
188. Talebi-Garakani, E. and A. Safarzade, *Resistance training decreases serum inflammatory markers in diabetic rats.* Endocrine.
189. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6.* Physiol Rev, 2008. **88**(4): p. 1379-406.
190. Seldin, M.M., et al., *Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis.* J Biol Chem. **287**(15): p. 11968-80.
191. Love-Gregory, L. and N.A. Abumrad, *CD36 genetics and the metabolic complications of obesity.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care. **14**(6): p. 527-34.
192. Boyle, J.J., *Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture.* Curr Vasc Pharmacol, 2005. **3**(1): p. 63-8.
193. Zhu, W., W. Li, and R.L. Silverstein, *Advanced glycation end products induce a prothrombotic phenotype in mice via interaction with platelet CD36.* Blood. **119**(25): p. 6136-44.
194. Campbell, J.E., et al., *Voluntary wheel running initially increases adrenal sensitivity to adrenocorticotrophic hormone, which is attenuated with long-term training.* J Appl Physiol, 2009. **106**(1): p. 66-72.
195. Sousa e Silva, T., et al., *Prolonged physical training decreases mRNA levels of glucocorticoid receptor and inflammatory genes.* Horm Res Paediatr. **74**(1): p. 6-14.

196. Tsatsoulis, A. and S. Fountoulakis, *The protective role of exercise on stress system dysregulation and comorbidities.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1083**: p. 196-213.

197. Izadpanah, A., et al., *A Short-term Diet and Exercise Intervention Ameliorates Inflammation and Markers of Metabolic Health in Overweight/Obese Children.* Am J Physiol Endocrinol Metab.

198. Packer, N. and L. Hoffman-Goetz, *Exercise training reduces inflammatory mediators in the intestinal tract of healthy older adult mice.* Can J Aging. **31**(2): p. 161-71.

Tesis Doctoral de la Lic. Camila Martinez Calejman para optar al grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires por la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

El presente trabajo de tesis doctoral titulado "*Cambios morfológicos y funcionales en la corteza adrenal de un modelo animal de resistencia a la insulina inducida por la administración de una dieta rica en sacarosa*" fue realizado en el Laboratorio de Endocrinología Molecular (Facultad de Medicina- UBA y CEFyBO/ CONICET) bajo la dirección de los Prof. Dres. Cora B. Cymeryng y Pablo Arias.

Lic. Camila Martinez Calejman	**Prof. Dra. Cora B. Cymeryng**	**Prof. Dr. Pablo Arias**
Tesista	Directora	Director

Lugar y Fecha: Buenos Aires, 13 de noviembre de 2012