

D.36. Salud humana

Rol del estrés del retículo endoplasmático y de la respuesta inflamatoria en la disfunción de las células β pancreáticas inducida por dieta rica en fructosa

Autor: Farromeque Vásquez, Sherley Catherine; shirley_cfv@hotmail.com

Profesor/a guía: Maiztegui, Bárbara; barmaiztegui@hotmail.com

Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA) (UNLP-CONICET-CeAs CICPBA), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Resumen

La administración de una dieta rica en fructosa (DRF) a ratas normales induce cambios endocrino-metabólicos similares a los de la prediabetes (PD) humana, donde el estrés del retículo endoplasmático (RE) tendría un rol crucial. Nuestro objetivo fue estudiar el rol del estrés del RE y de la respuesta inflamatoria en la disfunción de las células β pancreáticas inducida por DRF. Para ello, ratas macho normales se alimentaron 21 días con una dieta comercial estándar y agua corriente (C), o con el mismo alimento y una solución acuosa de fructosa al 10% p/v (DRF). Al sacrificio se midieron los niveles séricos de glucosa, triglicéridos (TG), col-total, col-HDL y se calculó el índice de insulinoresistencia (IR) dado por la relación TG/col-HDL. Se extrajo el páncreas y se aislaron los islotes para medir secreción de insulina estimulada por glucosa (SIEG) y los niveles de expresión génica (qPCR) de marcadores de estrés del RE, autofagia, inflamación y apoptosis. Las ratas DRF aumentaron significativamente los niveles de TG, col-noHDL y el índice IR, y no tuvieron cambios en col-total y col-HDL. En ellas también aumentó la SIEG (con glucosa 16,7 mM) y los niveles de ARNm de los marcadores de estrés del RE (CHOP, ATF4 y XBP1s), autofagia (HSc70), apoptosis (Casp-3, Casp-12, Bcl-2 y Bad) e inflamación (TNF- α , IL-1 β y PAI-1); $p < 0,05$. En conclusión, la DRF induce dislipemia, IR, sobrecarga funcional de las células β , estrés del RE, apoptosis y la respuesta inflamatoria, contribuyendo a promover la disfunción y disminución de la masa de células β . Una alternativa prometedora para desarrollar nuevas herramientas terapéuticas de prevención y tratamiento de la DT2 podría ser la atenuación del estrés del RE a través de chaperonas químicas.

Palabras clave: Prediabetes, Disfunción pancreática, Estrés del Retículo endoplasmático

INTRODUCCIÓN

La Diabetes tipo 2 (DT2) es una enfermedad crónica grave, frecuentemente asociada a otros factores de riesgo cardiovascular como hipertensión arterial, obesidad central y dislipemia. Su prevalencia crece de forma alarmante a nivel mundial, estimándose que para el año 2045, 693 millones de personas en el mundo se verán afectadas por esta enfermedad (Cho et al., 2018). Este hecho, convierte a la DT2 en un serio problema de salud pública, condicionado por el desarrollo y progresión de sus complicaciones crónicas discapacitantes y el elevado costo de su atención (Bolin, Gip, Mörk, & Lindgren, 2009). Previo a la manifestación clínico-metabólica de la DT2 existe un periodo de disfunción metabólica denominado prediabetes (PD), que se caracteriza por una glucemia de ayunas alterada, tolerancia a la glucosa alterada o una combinación de ambas, en el cual ya se manifiestan las complicaciones micro y macroangiopáticas (DeFronzo & Abdul-Ghani, 2011; Juan J. Gagliardino et al., 2018). Por lo tanto, dicho estadio no debe considerarse una preenfermedad sino un estadio patológico que resulta fundamental tratar adecuadamente para prevenir su progresión a DT2.

En la PD, la insulinoresistencia (IR) periférica induce un aumento compensatorio de la secreción de insulina,

provocando una sobrecarga funcional de las células β pancreáticas, que promueve su agotamiento y, consecuentemente, el desarrollo de DT2 (Poitout & Robertson, 2002, 2008).

El retículo endoplasmático (RE) cumpliría un rol crucial en el desarrollo y progresión de la PD a DT2. Las proteínas que se sintetizan en esta organela sufren modificaciones post-traduccionales tales como la N-glicosilación, la formación de puentes disulfuro, y, fundamentalmente, el plegamiento correcto de sus cadenas polipeptídicas. Este proceso requiere de proteínas llamadas chaperonas que colaboran además con el control de calidad de las proteínas que se procesan en el RE. Cualquier alteración de la función del RE, como la síntesis excesiva de proteínas y la acumulación de proteínas mal plegadas, dispara lo que se denomina "estrés del RE" (Rutkowski & Hegde, 2010).

Diferentes estímulos ambientales como hipoxia, privación de nutrientes, alteraciones metabólicas, cambios en los niveles de Ca^{+2} intraluminal y la presencia de un entorno oxidativo, promueven un plegamiento de proteínas aberrante y desencadenan estrés del RE. Las células β son muy sensibles al estrés de RE debido a su alta tasa de síntesis de proinsulina en respuesta a las variaciones en la concentración de glucosa,

especialmente en un estado de IR, como lo demuestran estudios recientes (Cnop, Toivonen, Igoillo-Esteve, & Salpea, 2017; Eizirik, Cardozo, & Cnop, 2008; Flamment, Hajdouch, Ferré, & Foufelle, 2012; Nakatani et al., 2005; Ozcan, 2004). Este plegamiento anormal de las proteínas o estrés del RE desencadena un mecanismo compensatorio llamado respuesta a proteínas mal plegadas o UPR (del inglés: *Unfolded Protein Response*), que incluye diferentes mecanismos que la célula pondrá en marcha con el fin de atenuarlo y restaurar la homeostasis del RE (Rutkowski & Kaufman, 2004).

Existen tres proteínas transmembrana del RE que actúan como sensores del estrés del RE: PERK (Protein Kinase RNA-like ER Kinase), IRE1 (Inositol- Requiring Enzyme 1) y ATF 6 (Activating Transcription Factor 6) (Araki, Oyadomari, & Mori, 2003).

La activación de estas tres proteínas desencadena diferentes mecanismos compensatorios que conducen a:

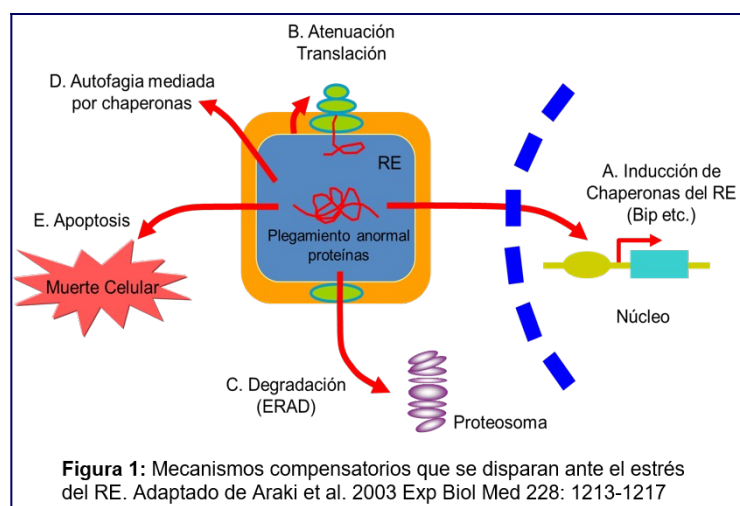
- A) aumentar la expresión génica de proteínas que faciliten el correcto plegamiento de proteínas en el RE, como la chaperona (Bip/GRP78);
- B) atenuar la traducción proteica con el fin de reducir la velocidad de síntesis de proteínas, evitando

la acumulación de proteínas mal plegadas;

C) aumentar la síntesis de componentes de la maquinaria de degradación asociada al RE llamada ERAD, para eliminar proteínas mal plegadas en el citosol mediante el sistema ubiquitina-proteosoma; y

D) aumentar la degradación de proteínas mal plegadas a través del proceso de autofagia en el que interviene la chaperona Hsc70 que selecciona y dirige proteínas mal plegadas al interior del lisosoma a través del receptor lisosomal Lamp2A (Yin et al., 2012).

Si todos estos mecanismos compensatorios fallaran, finalmente se activa el pro-grama de muerte celular por apoptosis inducida por la proteína proapoptótica CHOP vía ATF4, la activación de la Cas-pasa-12 y la quinasa JNK que inhibe la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Oyadomari & Mori, 2004; Urano et al., 2000). (Figura 1).



La apoptosis o muerte celular programada, es una forma fisiológica de muerte celular que ocurre durante el desarrollo normal de los tejidos. Las células que entran en apoptosis se caracterizan por presentar diferentes cambios morfológicos, que incluyen reducción del volumen celular, condensación del citoplasma y de la cromatina que conlleva a la fragmentación nuclear y la formación de "cuerpos apoptóticos" (Hengartner, 2000).

La activación de la apoptosis se puede llevar a cabo por una vía extrínseca, una intrínseca (o mitocondrial) o una dependiente del RE. Estas vías requieren de la activación de una serie de proteínas cisteín-proteasas claves en el mecanismo de apoptosis llamadas caspasas, que se encuentran involucradas tanto en la iniciación como en la ejecución del programa de muerte.

La vía extrínseca se inicia cuando los ligandos de muerte, como el ligando Fas o el factor de necrosis tumoral $TNF\alpha$, se unen a sus receptores específicos asociados a una proteína llamada Fas. Esta vía activa la caspasa 8 y posteriormente la caspasa 3, que conduce a la ejecución de la apoptosis (Hengartner, 2000).

La vía intrínseca requiere la existencia de estímulos originados dentro de las células, siendo la mitocondria el eje central de dichas señales. Existen muchas proteínas

que regulan esta vía, siendo la familia de proteínas Bcl-2 una de las más importantes. Algunos miembros de esta familia, como Bax, Bak y las proteínas "sólo-BH3", Bad, Bik, Noxa y PUMA presentan actividad proapoptótica ya que promueven la liberación del citocromo-c desde la mitocondria al citoplasma (entre otras acciones). También existen miembros de esta familia cuya función es antiapoptótica, tal es el caso de la propia proteína Bcl-2 (que da origen al nombre de la familia) y Bcl-XL que bloquean la liberación del citocromo c (Hengartner, 2000; Taylor, 2008).

Cuando el estrés del RE es excesivo, y la UPR es incapaz de restaurar la homeostasis de esta organela, se activa el proceso de apoptosis en el que se ponen en juego 3 mecanismos diferentes (Araki et al., 2003):

1- La expresión del factor de transcripción CHOP (C/EBP homologous Protein-GADD153) que es causada por la activación de ATF4, ATF6 y XBP1s. CHOP reprime la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o Bcl-XL, y aumenta la de proteínas proapoptóticas como Bax y Bak (Oyadomari & Mori, 2004).

2- La activación de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) ocurre tras la activación del complejo IRE1-TRAF2-ASK1 (Urano et al., 2000). JNK fosforila a la proteína

antiapoptótica Bcl-2, que al disociarse de Bax promueve la formación de poros en el RE y en la mitocondria, alterando así la homeostasis del Ca^{+2} en estas organelas. A su vez, JNK fosforila a IRS1/2 en residuos de serina, produciendo una disminución en la vía de señalización de la insulina (Ozcan, 2004).

3- Activación de la caspasa-12. La procaspasa 12 se encuentra localizada en la membrana del RE interaccionando con IRE1 y la proteína adaptadora TRAF2 (Yoneda et al., 2001). En condiciones de estrés del RE, la procaspasa 12 se disocia de TRAF2, se dimeriza y la convierte en caspasa-12 activa. Por otro lado, los cambios en la concentración de Ca^{+2} en el RE, mitocondria y el citoplasma intervienen en la activación de la apoptosis. A su vez, hay proteínas de la familia de Bcl-2 como las sólo-BH3 que se encuentran en la membrana del RE y regulan la homeostasis del Ca^{+2} . En presencia de estrés del RE, estas proteínas experimentan cambios conformacionales en la membrana del RE, conduciendo a la liberación de Ca^{+2} . El Ca^{+2} rápidamente es internalizado por la mitocondria, conduciendo al colapso de la membrana mitocondrial interna que provoca la liberación del citocromo c y posterior activación de la apoptosis. Por otro lado, la inflamación es un mecanismo adaptativo que se inicia en

respuesta al daño celular causado por estímulos endógenos o exógenos como infecciones, traumatismos o agentes químicos (Kawasaki, Asada, Saito, Kanemoto, & Imaizumi, 2012). La inflamación juega un rol crucial en el desarrollo y progresión de enfermedades metabólicas crónicas, como la diabetes (Thounaojam, Nammi, & Jadeja, 2016) donde el tejido adiposo tiene un rol clave. Este tejido tiene la capacidad de liberar una gran cantidad de citoquinas proinflamatorias denominadas adipoquinas, como por ejemplo el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), la interleuquina-6 (IL-6), el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), el angiotensinógeno, la leptina y la resistina. La inflamación se encuentra íntimamente relacionada al estrés del RE. La evidencia muestra que la alteración de la homeostasis del RE desencadena una respuesta inflamatoria a través de las tres vías de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) descritas anteriormente (Amen, Sarker, Ghildyal, & Arya, 2019; Mohan, R, Brown, Ayyappan, & G, 2019; Ozcan, 2004).

La fosforilación de IRE-1 α permite la formación del complejo IRE1-TRAF2 que provoca la activación de la señalización aguas abajo de JNK y NF- κ B (Chen, Chen, Wang, & Liang, 2015). NF- κ B se trasloca al núcleo e induce la expresión de

genes que codifican las citoquinas proinflamatorias TNF- α , interleuquina-1 β (IL-1 β) e IL-6, desencadenando una respuesta inflamatoria. Además, IRE-1 fosforilada interactúa con una proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), ASK1, que finalmente fosforila a JNK y desencadena la inflamación.

La respuesta inflamatoria también afecta la sensibilidad a la insulina. Estas citoquinas inflamatorias junto con JNK, fosforilan a IRS1 en residuos de serina en lugar de tirosina, disminuyendo así la efectividad de la vía de señalización de la insulina y favoreciendo el desarrollo de IR (Amen et al., 2019; Ozcan, 2004).

Para conocer el mecanismo que determina la transición de la PD a la DT2 se han desarrollado diferentes modelos experimentales que reproducen la disfunción celular β . Se ha demostrado ampliamente que la administración de dietas ricas en fructosa (DRF) a ratas normales durante 3 semanas es capaz de inducir múltiples cambios metabólicos y endócrinos similares a los encontrados en la PD humana (Alzamendi et al., 2012; Castro et al., 2015; Fariña et al., 2013; Francini et al., 2010; Maiztegui B. et al., 2017, 2011; Maiztegui B., Borelli, Raschia, Del Zotto, & Gagliardino, 2009; Maiztegui, Román, Gagliardino, & Flores, 2018; Rebolledo et al., 2010; Román et al., 2014).

Los animales alimentados con una DRF presentan un aumento de los niveles séricos de triglicéridos, ácidos grasos libres (predominantemente saturados), insulina, leptina que provocan un aumento en el índice HOMA-IR, la aparición de un estado de dislipemia e IR (Maiztegui B. et al., 2009; Nandhini, Thirunavukkarasu, Ravichandran, & Anuradha, 2005; Thorburn, Storlien, Jenkins, Khouri, & Kraegen, 1989). Los islotes pancreáticos responden inicialmente al estado de IR con un aumento de la secreción de insulina, que permite mantener los niveles de glucemia basal en rangos normales, pero no los postprandiales, evidenciando una tolerancia a la glucosa aumentada, y por lo tanto, una deficiencia relativa de la función de las células β (Alzamendi et al., 2012; Castro et al., 2015; Fariña et al., 2013; Francini et al., 2010; Maiztegui B. et al., 2017, 2011, 2009; Maiztegui et al., 2018; Rebolledo et al., 2010; Román et al., 2014)). Este modelo resulta ser apropiado y muy útil para estudiar la patogenia de la transición de PD a DT2 y su posible prevención y/o tratamiento.

Todos estos cambios plurimetabólicos están asociados a un aumento del estrés oxidativo y a una disminución de la masa de las células β pancreáticas condicionada por un aumento de su tasa de apoptosis (Maiztegui B. et al., 2009).

Sin embargo, aún no se conoce la posible participación del estrés del RE en el mecanismo por el cual la DRF disminuye la masa de las células β en estos animales.

En base a estos conocimientos previos, la **hipótesis** del presente trabajo consiste en que la administración de una DRF a ratas normales durante 3 semanas induce un estado de PD con IR e hipertrigliceridemia que estaría asociado a un aumento del estrés del RE y de la respuesta inflamatoria, que serían responsables de la apoptosis de las células β y cumplirían, por lo tanto, un rol crucial en el mecanismo por el cual disminuye la masa de estas células en la DT2.

Entender el papel que cumple el estrés del RE en la disfunción y la disminución de la masa de células β características de la DT2, permitiría desarrollar nuevas estrategias de prevención y tratamiento de esta enfermedad.

OBJETIVOS

Los objetivos generales de este trabajo son:

- Evaluar la participación del estrés de RE en las alteraciones endocrino-metabólicas inducidas por la administración de una DRF a ratas normales durante 21 días.
- Establecer los mecanismos involucrados y las relaciones causales entre los procesos inflamatorios, el estrés

del retículo y la falla de las células β pancreáticas en este modelo de PD.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

Desarrollar y caracterizar el modelo experimental de PD en ratas normales mediante la administración de una DRF durante 21 días, evaluando:

- Los parámetros séricos y nutricionales e índices de IR.
- La secreción de insulina frente a distintas concentraciones de glucosa.
- La expresión génica insular de marcadores de los diferentes mecanismos compensatorios desencadenados por el estrés del RE en islotes pancreáticos (CHOP, ATF4, XBP1, JNK).
- La expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria insular (TNF α , IL-1 β , PAI-1).
- La expresión de genes marcadores de autofagia (Hsc70).
- La expresión génica insular de los marcadores de las diferentes vías apoptóticas que conducen a la disminución de la masa de las células β (Caspasa-12, Caspasa-3, Bad, Bcl-2).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Utilizamos ratas Sprague Dawley machos normales de dos meses de edad, mantenidas en un ambiente con 23°C de temperatura, 50% de humedad y ciclos de 12 horas de luz/oscuridad controlados.

Para el manejo de los animales se siguieron las indicaciones de la 3ra edición de la guía de principios éticos para la experimentación con animales elaborada por la Swiss Academy of Medical Sciences. El protocolo fue evaluado y aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP (N° aprobación: T01032021). Las ratas se criaron y se mantuvieron en el Bioterio del Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

Formación de los grupos experimentales

Las ratas se dividieron al azar en dos grupos:

- Grupo control (C21): con libre acceso a una dieta comercial estándar (alimento extrusado rata-ratón GANAVE) y agua corriente durante 21 días.
- Grupo tratado con una DRF 21 días (DRF21): recibió la misma dieta comercial utilizada en C21 con el agregado de fructosa al 10% p/v en el agua de bebida durante 21 días.

Durante todo el período de tratamiento se registró la cantidad de bebida y comida sólida ingeridos diariamente y el peso corporal (una vez por semana) y se

calcularon las calorías consumidas diariamente.

Parámetros séricos: determinación de glucemias, trigliceridemias, colesterol total, col-HDL, cálculo de índices de insulinoresistencia

Al momento del sacrificio se obtuvieron muestras de sangre de todos los animales y se determinó la glucemia utilizando tiras reactivas (AccuCheck Performa Nano System Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Posteriormente se determinó el perfil lipídico midiendo el contenido de TG, colesterol total y colesterol HDL empleando métodos enzimáticos- colorimétrico comerciales (Wiener Labs). Con los datos obtenidos se calculó el índice de IR mediante la relación TG/colesterol-HDL (LAWS & REAVEN, 1992).

Obtención de islotes de Langerhans

Se extirparon los páncreas enteros y se les eliminó cuidadosamente el tejido adiposo y el tejido conectivo, se los mantuvo en buffer KRB y se los digirió con colagenasa (Roche Diagnostics) aplicando ciclos alternados de calor y agitación vigorosa (Lacy & Kostianovsky, 1967). El grado de digestión se controló bajo lupa estereoscópica y la misma se detuvo (mediante el agregado de 50 ml de KRB frío) cuando se constató que el tejido exocrino había sido completamente digerido y que los islotes habían sido liberados. Los islotes se recolectaron

manualmente en forma individual bajo lupa estereoscópica en buffer KRB con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% para desarrollar los estudios que se detallan a continuación:

Secreción de insulina estimulada por glucosa (SIEG)

Se incubaron grupos de 5 islotes provenientes de los distintos grupos experimentales en buffer KRB, suplementado con BSA al 1% y diferentes concentraciones de glucosa (3,3 y 16,7mM) durante 1 h a 37°C (J. J. Gagliardino, Nierle, & Pfeiffer, 1974). Al término de este periodo se recuperó el medio de incubación para la posterior determinación de la concentración de insulina mediante ELISA (Insulin mouse, rat EIA Kit; Cayman Chemical).

RT-PCR en tiempo real: determinación del nivel de expresión de genes relacionados con el estrés del RE, apoptosis, autofagia y mediadores de la respuesta inflamatoria insular:

Aislamiento de ARN total insular y síntesis de ADN complementario (ADNc)

Se aisló el ARN total de islotes utilizando Trizol Reagent (Ambion, Life Technologies) y se cuantificó por medida de absorbancia en el equipo Multimode Microplate Reader - Synergy HT, Biotek Instrument, Inc. con el software Gen5 provisto por el equipo. La posible contaminación con proteínas o fenol se

controló midiendo la relación de absorbancia 260/280 nm. La integridad del ARN se controló mediante electroforesis en gel de agarosa-formaldehído al 1%, verificando la presencia de las bandas características de ARNr 28s y 18s.

Para la síntesis del ADNc, se realizó la transcripción reversa (RT) a partir de 1ug de ARN total utilizando la enzima transcriptasa reversa SuperScript III (200 U/μl).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

El ADNc se utilizó como molde en la técnica de PCR cuantitativa (qPCR). Cada tubo de reacción se amplificó con la mezcla Platinum SYBR Green qPCR Supermix (BioRad) en presencia de cebadores específicos.

El perfil de ciclos térmicos utilizado para la cuantificación de la expresión génica fue: un paso inicial de 3 minutos a 95°, seguido de 30 ciclos de 3 pasos cada uno: un paso de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, un paso de unión específica de oligonucleótidos de 45 segundos a 65°C y un último paso de extensión de 30 segundos a 72°C. El programa finaliza con un paso único de 10 minutos a 72°C seguido de la curva de fusión, que se obtiene aumentando la temperatura desde 55 a 95°C, con registros de fluorescencia cada medio grado de temperatura. Los datos se

expresaron como expresión génica relativa tras su normalización respecto al gen de β -actina que se utilizó como referencia y fueron calculados utilizando el método $\Delta\Delta CT$.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (versión 15.0, SPSS, Inc, Chicago, IL) por test t de Students (para muestras independientes con distribución normal) seguido por el test de Tukey o Tamhane (para datos con distribución normal e igual varianza). Todos los datos se expresaron como la media $\pm$ error estándar de la media (EEM). Consideramos diferencias significativas cuando el valor de p fue menor a 0,05.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Desarrollo y caracterización del modelo

días (DRF21) bebieron un volumen significativamente mayor que las del grupo C21, mientras que la cantidad de comida sólida ingerida fue significativamente menor (Tabla 1). El 62,8% del alimento sólido consumido corresponde a hidratos de carbono (HdeC), proteínas (P) y lípidos (L), con una relación porcentual de 45:43:12 respectivamente, mientras que el 37,2% restante está representado por fibras, cenizas, calcio y fósforo. El agregado de fructosa en el grupo DRF21, hace que estos animales consuman una mayor cantidad de HdeC provenientes de la fructosa. En consecuencia el aporte de nutrientes a lo largo del tratamiento fue cualitativamente diferente al del grupo control modificándose la relación porcentual de HdeC:P:L ingeridos en 64:28:8. A pesar

Grupo	Aumento de peso corporal (g/rata/día)	Consumo de Bebida (ml/rata/día)	Consumo de Comida (g/rata/día)	Aporte calórico (cal/rata/día)
C21	4,21 $\pm$ 0,19	29,96 $\pm$ 1,39	21,81 $\pm$ 0,51	63,00 $\pm$ 1,80
DRF21	4,21 $\pm$ 0,56	83,09 $\pm$ 7,18*	15,65 $\pm$ 1,65*	78,47 $\pm$ 3,39*

Tabla 1: Peso y parámetros dietarios. Incremento del peso registrado luego de 21 días de tratamiento (expresado como g/animal/día); consumo de bebidas (agua o DRF) y alimentos sólidos (expresados como ml o gramos por animal por día respectivamente), y aporte de calorías por animal por día. Los valores representan la media $\pm$ EEM (error estándar de la media). n=3 casos por grupo experimental. *p<0,05 vs. C21 |

experimental de prediabetes

Peso corporal, bebida comida y calorías ingeridas

Los resultados obtenidos demostraron que las ratas alimentadas con DRF durante 21

de que los animales del grupo DRF21 disminuyeron la ingesta de alimento sólido respecto a los del grupo C21, sólo compensaron parcialmente el aumento en el aporte calórico aportado por la fructosa,

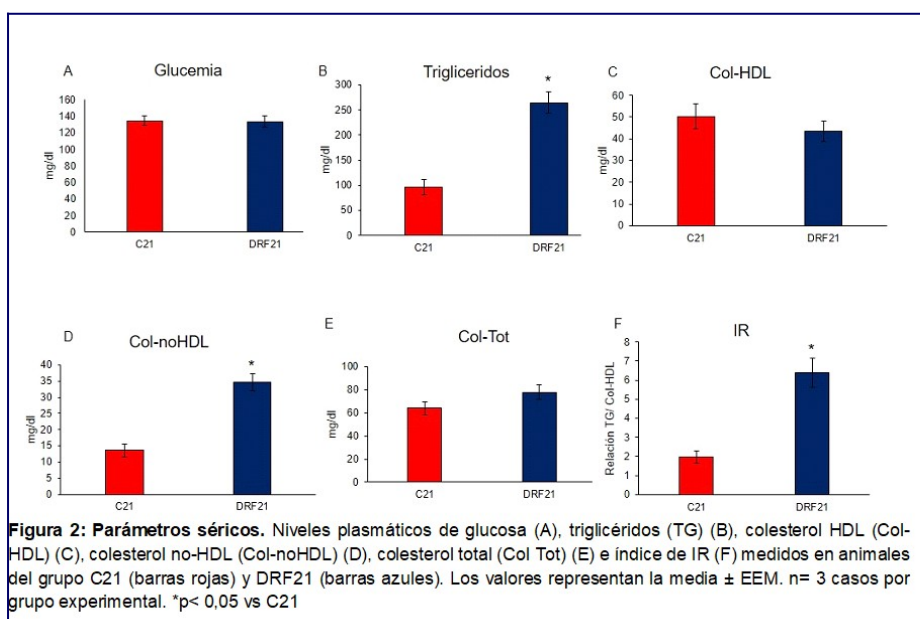
por lo que registramos una diferencia significativa en el consumo diario de calorías entre ambos grupos que no se tradujo en un aumento del peso corporal (Tabla 1).

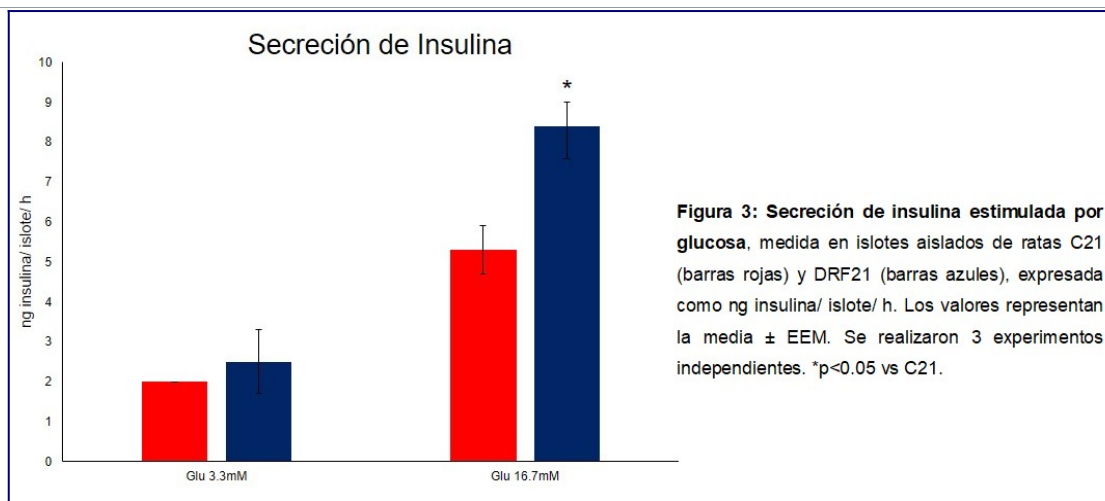
Parámetros séricos e índice de IR

Como se observa en la Figura 2, los niveles de glucosa en sangre fueron similares en ambos grupos experimentales, sin embargo, los niveles de TG plasmáticos de las ratas DRF21 fueron significativamente mayores que los del grupo C21. En este grupo de animales, además, se observó un aumento significativo de los niveles de Col-noHDL respecto al grupo control, evidenciando el desarrollo de un cuadro de dislipemia. A su vez, no se observaron diferencias significativas en los niveles de Colesterol total, Col-HDL entre los grupos que recibieron fructosa por 21 días y el grupo control. Con estos resultados, el índice de IR (relación TG/Col-HDL) resultó ser significativamente mayor en el grupo

DRF21 respecto al grupo control (Figura 2-F). Estos valores

demuestran fehacientemente la existencia de un cuadro de dislipemia e IR en estos animales, semejante al encontrado en una PD humana (Francini et al., 2010; Maiztegui B. et al., 2017, 2011, 2009; Maiztegui et al., 2018; Román et al., 2014).



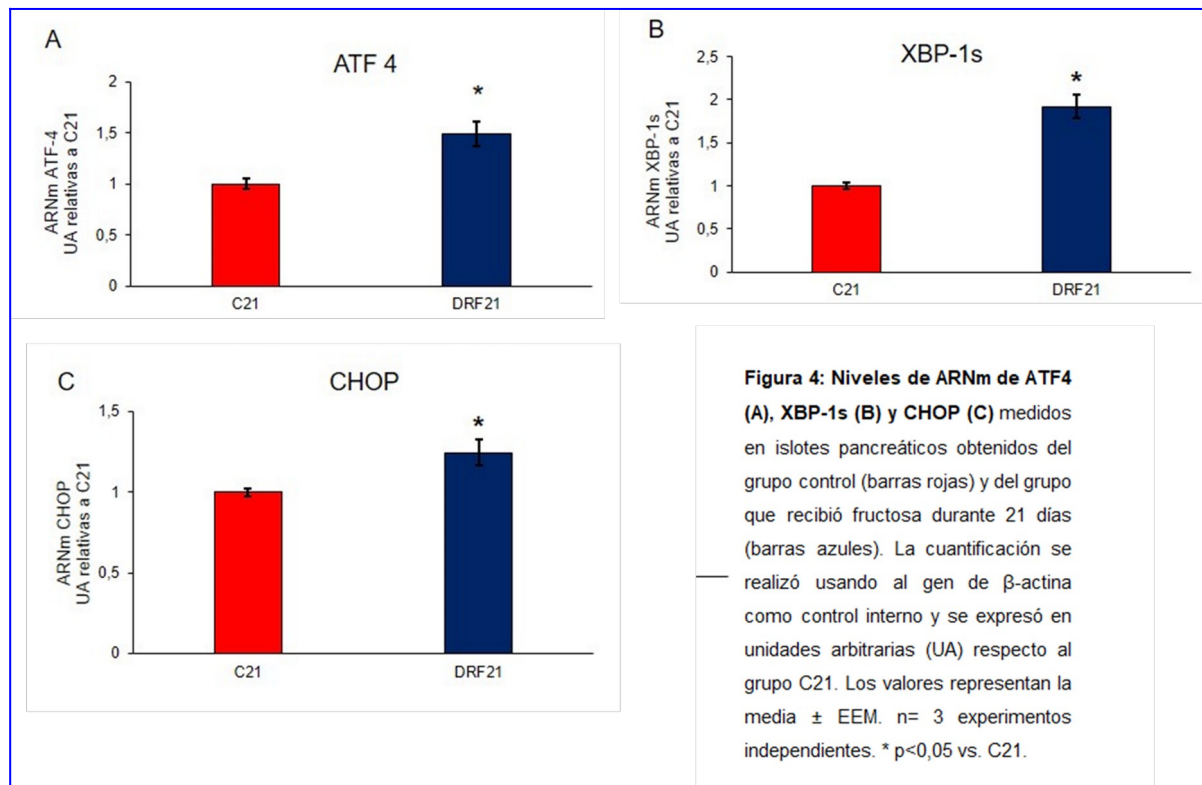


Secreción de insulina estimulada por glucosa (SIEG) No hubo diferencias significativas en la secreción de insulina entre ambos grupos frente a concentraciones basales de glucosa (3,3 mM), sin embargo, se registró un aumento significativo en los islotes provenientes de ratas DRF cuando se los expuso a una concentración elevada de glucosa (16,7 mM) (Figura 3). El aumento de secreción de insulina compensaría la IR periférica para mantener la glucemia dentro de un rango normal, demostrando que la administración de una DRF induce una sobrecarga funcional a las células β pancreáticas.

Efecto de la DRF sobre la expresión génica insular de diferentes marcadores de estrés del RE, apoptosis, autofagia e inflamación.

- Marcadores de mecanismos desencadenados por el estrés del RE

La sobrecarga funcional compensatoria provoca el agotamiento de las células β y el consecuente desarrollo de DT2. En este proceso, el RE cumple un rol protector esencial, ya que tanto la síntesis excesiva de proteínas como la acumulación de proteínas mal plegadas puede disparar el estrés del RE. Las células β son muy sensibles al estrés del RE debido a su alta tasa de síntesis de proinsulina, especialmente en el estado de IR como el que hemos descrito en nuestro modelo. En este trabajo se demostró que los animales alimentados con DRF durante 21 días evidenciaron un aumento significativo de los niveles de ARNm de los marcadores de la respuesta a proteínas mal plegadas desencadenada por el estrés del RE, tales como ATF4, XBP-1s y CHOP (Figura 4).

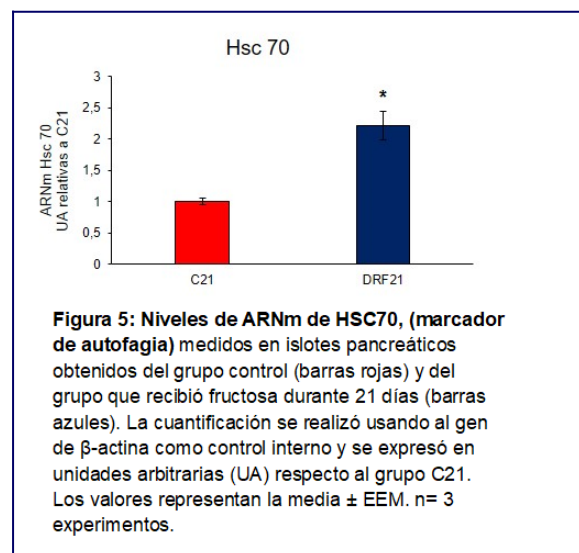


Marcadores del proceso de autofagia

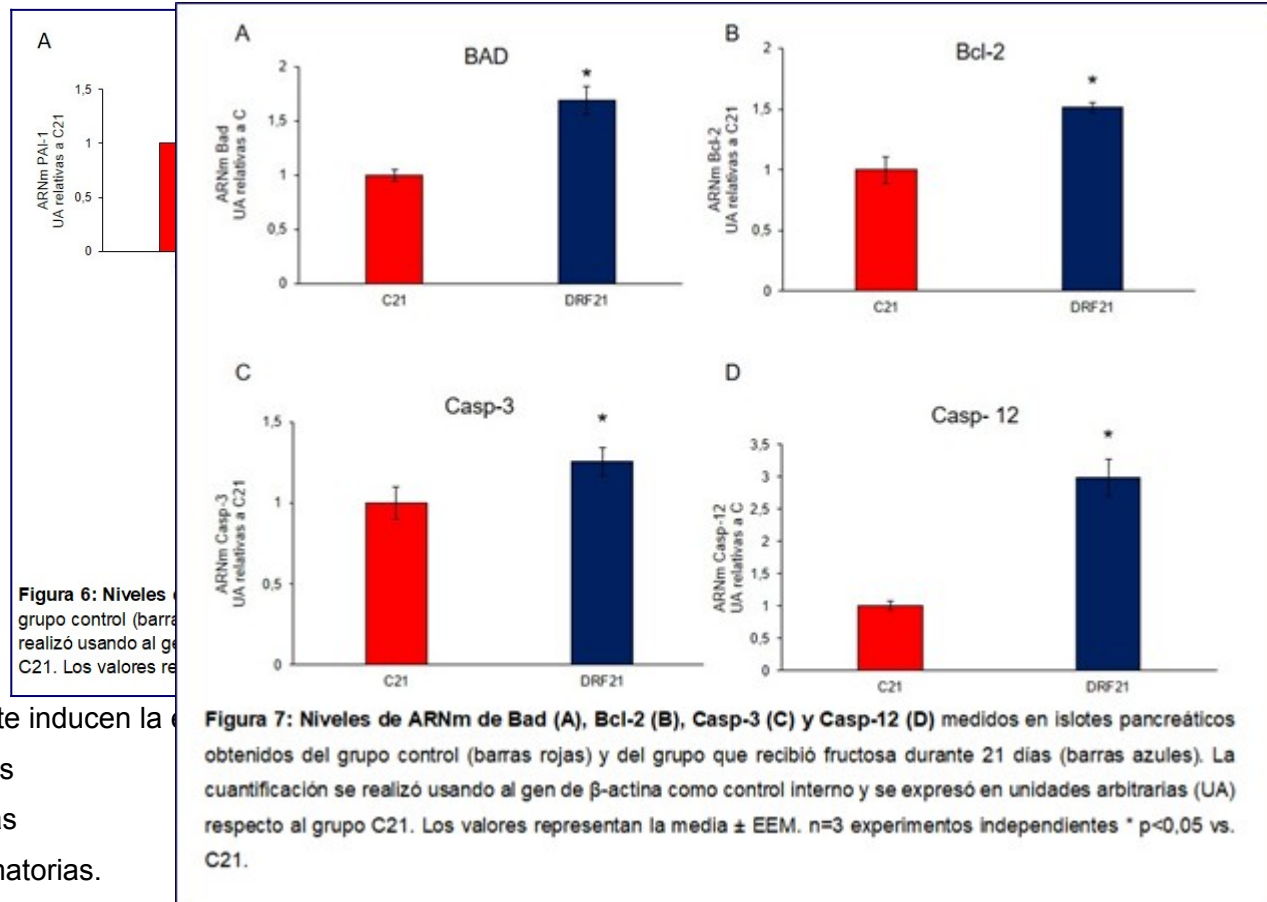
El mecanismo de autofagia se desencadena como una respuesta compensatoria a la presencia de proteínas mal plegadas, mediante la acción de Hsc70. Las ratas DRF21 mostraron un aumento significativo de los niveles de expresión génica del marcador de autofagia Hsc70 (Figura 5), lo que promoverían a la disfunción y disminución de la masa de células β

Marcadores de la respuesta inflamatoria.

La inflamación es un proceso que juega un rol importante en el desarrollo y/o progresión de enfermedades metabólicas



crónicas, como la DT2, y se encuentra íntimamente relacionado al estrés del RE. La activación de las tres proteínas sensoras del estrés del RE (IRE1, PERK y ATF6) activan a NF κ B y a JNK, que



finalmente inducen la
diferentes
citoquinas
proinflamatorias.

Los resultados de la
expresión génica de los marcadores de la
respuesta inflamatoria demostraron que
los animales DRF21 presentaron un
aumento significativo de los niveles de
ARNm de los mediadores de la respuesta
inflamatoria (IL1- β , PAI-1 y TNF- α) con
respecto al grupo control (Figura 6),
evidenciando el desarrollo de un cuadro
inflamatorio en estas ratas. Esta respuesta
inflamatoria favorece aún más el
desarrollo de IR debido a que el aumento
de las citoquinas proinflamatorias, junto
con JNK, fosforilan a IRS1 en residuos de
serina, disminuyendo la efectividad de la
vía de señalización de insulina y, por lo

tanto, favoreciendo aún más el desarrollo
de IR.

Marcadores de apoptosis

El mecanismo de apoptosis es la principal
causa de la pérdida de masa de células β
en la DT2. En este trabajo se estudió la
expresión génica por qPCR de distintos
factores que modulan la apoptosis de
manera positiva (pro-apoptóticos) o de
manera negativa (antiapoptóticos). En los
animales del grupo DRF21 se observó un
aumento significativo de los niveles de
ARNm de Caspasa-3 (principal enzima
efectora de las vías intrínseca y extrínseca
de la apoptosis), respecto del grupo

control C21 (Figura 7). Paralelamente, los niveles de ARNm de la proteína proapoptótica Bad también fueron significativamente mayores en las ratas DRF21 (Figura 7). De manera inesperada, cuando se analizó la expresión génica de la proteína antiapoptótica Bcl- 2, se observó un aumento de los niveles de ARNm de esta proteína en el grupo DRF21. Si bien hubiésemos esperado una disminución de su expresión, la relación entre la proteína antiapoptótica Bcl-2 y la proteína proapoptótica Bad (relación Bcl-2/Bad) fue menor a 1 en el grupo DRF21, evidenciando que la proteína proapoptótica Bad es la que está en juego y la responsable del aumento de apoptosis en los animales DRF21.

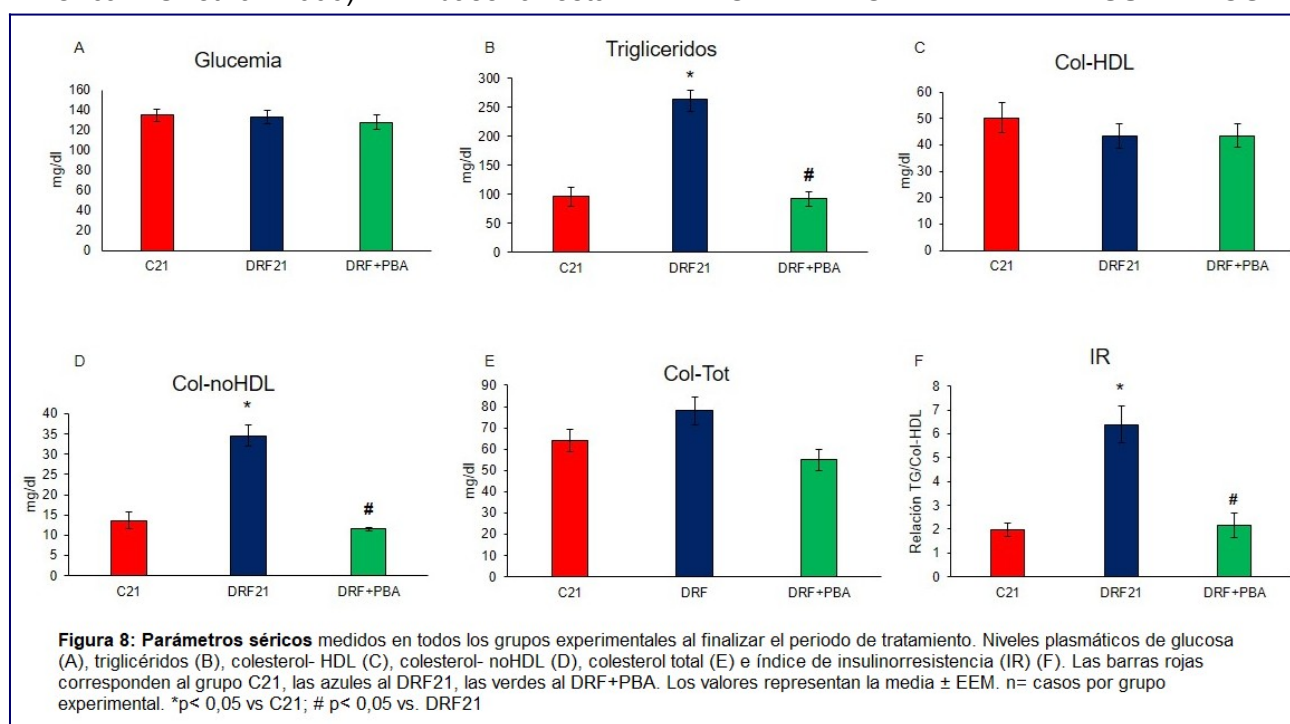
Cuando el estrés del RE es excesivo y los mecanismos compensatorios son incapaces de restaurar la homeostasis de esta organela, se activa el proceso de apoptosis, mediante la activación de una caspasa específica del estrés del RE, la caspasa-12. En condiciones normales, la pro-caspasa-12 se localiza en la membrana del RE interaccionando con IRE1 y la proteína adaptadora TRAF2, pero en condiciones de estrés, la procaspasa-12, se disocia y se dimeriza, convirtiéndose en caspasa-12 activa. En este trabajo, los resultados obtenidos, mostraron que los animales DRF21 días tuvieron un aumento significativo de los

niveles de ARNm de la caspasa 12, evidenciando un incremento del proceso de apoptosis en estos animales, hecho que contribuye a la disminución de la masa de las células β .

Nuestros resultados evidencian que la atenuación de la señalización UPR iniciada por el estrés del RE resultaría una alter-nativa prometedora para desarrollar nuevas herramientas terapéuticas para prevenir el desarrollo de DT2. En este sentido, chaperonas químicas como el ácido 4-fenil butírico (PBA), podrían optimizar el plegamiento de las proteínas y disminuir el estrés del RE facilitando así el control de la homeostasis glucémica y la recuperación de la masa y función celular β en la DT2 (Xu G et al. 2016; Ozcan U et al 2006). En base a esta

Los primeros resultados preliminares mostraron que su administración a ratas DRF durante 5 días en una dosis de 50 mg/kg/día, previno la aparición de los parámetros séricos característicos del fenotipo prediabético, observándose una disminución significativa de los niveles séricos de triglicéridos y Col-noHDL y del índice de IR (Figura 8).

COMPENDIO DE RESULTADOS



presunción, quisimos evaluar la posibilidad de prevenir el desarrollo de las alteraciones plurimetabólicas inducidas por la DRF mediante la administración de un inhibidor del estrés del RE, el ácido 4-fenil butírico (PBA, Sigma).

OBTENIDOS Y CONCLUSIONES

Las ratas normales alimentadas con fructosa al 10% en el agua de bebida durante 3 semanas presentaron glucemias dentro de los valores normales, sin embargo, mostraron un estado

hipertrigliceridémico, junto con niveles aumentados de colesterol noHDL. Además, estos animales presentaron un aumento del índice de IR (TG/col-HDL). Todos estos parámetros indican un cuadro de dislipemia e IR en los animales tratados con una DRF, similar al encontrado en la PD humana.

El volumen de agua consumido por estos animales fue significativamente mayor y la ingesta de comida fue significativamente menor respecto a los animales del grupo control. A pesar de que los animales del grupo DRF21 disminuyeron la ingesta de alimento sólido respecto a los del grupo C21, sólo compensaron parcialmente el aumento en el aporte calórico de la DRF por lo que registramos una diferencia significativa en el consumo diario de calorías entre ambos grupos.

La administración de fructosa durante 21 días indujo un estrés del RE evidenciado por el aumento de los niveles de ARNm de ATF4, XBP1s y la proteína proapoptótica CHOP. Además, se evidenció la activación del proceso de autofagia mediada por chaperona con el aumento de los niveles de expresión génica de Hsc70, proteína encargada de seleccionar y dirigir las proteínas mal plegadas para su degradación.

En los animales que recibieron una DRF, aumentaron también los niveles de ARNm de Caspasa-12, Caspasa-3 y Bad,

sugiriendo un aumento de la muerte de células β por apoptosis. La disminución de la masa β se asoció además al desarrollo de un cuadro inflamatorio evidenciado por un aumento de los niveles de ARNm de las citoquinas proinflamatorias interleucina 1 β (IL-1 β), PAI-1 y TNF- α en este grupo de animales.

Resultados preliminares demostraron que las alteraciones de los parámetros séricos presentes en el modelo de PD fueron prevenidas por la administración de un inhibidor del estrés del RE.

Por lo tanto, podemos concluir que:

La administración de una DRF a ratas normales durante 21 días induce un estado de PD con dislipemia, insulinoresistencia y sobrecarga funcional de las células β , que estaría asociado a un aumento del estrés del RE y de la respuesta inflamatoria, responsables del aumento de apoptosis de las células β , causa principal que promueve la disminución de la masa β característica de la DT2.

Dado que algunas de estas alteraciones fueron prevenidas mediante el tratamiento con un inhibidor del estrés del RE, nuestros resultados son prometedores, ya que el uso de chaperonas químicas como el 4-PBA podría ser el instrumento que permita dilucidar el mecanismo íntimo desencadenante de la disfunción y la disminución de la masa de células β en la

PD, al igual que su posible utilización como nueva estrategia terapéutica para prevenir o retrasar el desarrollo de DT2.

Bibliografía

- Alzamendi, A., Giovambattista, A., García, M. E., Rebolledo, O. R., Gagliardino, J. J., & Spinedi, E. (2012). Effect of Pioglitazone on the Fructose-Induced Abdominal Adipose Tissue Dysfunction. *PPAR Research*, 2012, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2012/259093>
- Amen, O. M., Sarker, S. D., Ghildyal, R., & Arya, A. (2019). Endoplasmic Reticulum Stress Activates Unfolded Protein Response Signaling and Mediates Inflammation, Obesity, and Cardiac Dysfunction: Therapeutic and Molecular Approach. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 977. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00977>
- Araki, E., Oyadomari, S., & Mori, M. (2003). Impact of Endoplasmic Reticulum Stress Pathway on Pancreatic β -Cells and Diabetes Mellitus. *Experimental Biology and Medicine*, 228(10), 1213-1217. <https://doi.org/10.1177/153537020322801018>
- Bolin, K., Gip, C., Mörk, A. C., & Lindgren, B. (2009). Diabetes, healthcare cost and loss of productivity in Sweden 1987 and 2005—A register-based approach. *Diabetic Medicine*, 26(9), 928-934. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2009.02786.x>
- Castro, M. C., Massa, M. L., Arbeláez, L. G., Schinella, G., Gagliardino, J. J., & Francini, F. (2015). Fructose-induced inflammation, insulin resistance and oxidative stress: A liver pathological triad effectively disrupted by lipoic acid. *Life Sciences*, 137, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.07.010>
- Chen, L., Chen, R., Wang, H., & Liang, F. (2015). Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *International Journal of Endocrinology*, 2015, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/508409>
- Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., & Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 138, 271-281. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>
- Cnop, M., Toivonen, S., Igoillo-Esteve, M., & Salpea, P. (2017). Endoplasmic reticulum stress and eIF2 α phosphorylation: The Achilles heel of pancreatic β cells. *Molecular Metabolism*, 6(9), 1024-1039. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.06.001>
- DeFronzo, R. A., & Abdul-Ghani, M. (2011). Assessment and Treatment of Cardiovascular Risk in Prediabetes: Impaired Glucose Tolerance and Impaired Fasting Glucose. *The American Journal of Cardiology*, 108(3), 3B-24B. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.03.013>
- Eizirik, D. L., Cardozo, A. K., & Cnop, M. (2008). The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocrine Reviews*, 29(1), 42-61. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0015>
- Fariña, J. P., García, M. E., Alzamendi, A., Giovambattista, A., Marra, C. A., Spinedi, E., & Gagliardino, J. J. (2013). Antioxidant treatment prevents the development of fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction. *Clinical Science*, 125(2), 87-97. <https://doi.org/10.1042/CS20120470>
- Flamment, M., Hajdouch, E., Ferré, P., & Fougelle, F. (2012). New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23(8), 381-390. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.003>
- Francini, F., Castro, M. C., Schinella, G., García, M. E., Maiztegui, B., Raschia, M. A., ... Massa, M. L. (2010). Changes induced by a fructose-rich diet on hepatic metabolism and the antioxidant system. *Life Sciences*, 86(25-26), 965-971.

- <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.05.005>
- Gagliardino, J. J., Nierle, C., & Pfeiffer, E. F. (1974). The effect of serotonin on in vitro insulin secretion and biosynthesis in mice. *Diabetologia*, 10(5), 411-414. <https://doi.org/10.1007/BF01221630>
- Gagliardino, Juan J., Elgart, J. F., Bourgeois, M., Etchegoyen, G., Fantuzzi, G., Ré, M., ... Spinedi, E. (2018). Diabetes primary prevention program: New insights from data analysis of recruitment period. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 34(1), e2943. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2943>
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis: Abstract: Nature. *Nature*, 407(6805), 770-776.
- Kawasaki, N., Asada, R., Saito, A., Kanemoto, S., & Imaizumi, K. (2012). Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Scientific Reports*, 2(1), 799. <https://doi.org/10.1038/srep00799>
- Lacy, P. E., & Kostianovsky, M. (1967). Method for the Isolation of Intact Islets of Langerhans from the Rat Pancreas. *Diabetes*, 16(1), 35-39. <https://doi.org/10.2337/diab.16.1.35>
- LAWS, A., & REAVEN, G. M. (1992). Evidence for an independent relationship between insulin resistance and fasting plasma HDL-cholesterol, triglyceride and insulin concentrations. *Journal of Internal Medicine*, 231(1), 25-30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.1992.tb00494.x>
- Maiztegui B., Boggio, V., Román, C. L., Flores, L. E., Zotto, H. D., Ropolo, A., ... Gagliardino, J. J. (2017). VMP1-related autophagy induced by a fructose-rich diet in β -cells: Its prevention by incretins. *Clinical Science*, 131(8), 673-687. <https://doi.org/10.1042/CS20170010>
- Maiztegui B., Borelli, M. I., Madrid, V. G., Del Zotto, H., Raschia, M. A., Francini, F., ... Gagliardino, J. J. (2011). Sitagliptin prevents the development of metabolic and hormonal disturbances, increased β -cell apoptosis and liver steatosis induced by a fructose-rich diet in normal rats. *Clinical Science*, 120(2), 73-80. <https://doi.org/10.1042/CS20100372>
- Maiztegui B., Borelli, M. I., Raschia, M. A., Del Zotto, H., & Gagliardino, J. J. (2009). Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: β -cell mass, glucokinase, glucose metabolism, and insulin secretion. *Journal of Endocrinology*, 200(2), 139-149. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0386>
- Maiztegui, B., Román, C. L., Gagliardino, J. J., & Flores, L. E. (2018). Impaired endocrine-metabolic homeostasis: Underlying mechanism of its induction by unbalanced diet. *Clinical science (London, England: 1979)*, 132(8), 869-881. <https://doi.org/10.1042/CS20171616>
- Mohan, S., R, P. R. M., Brown, L., Ayyappan, P., & G, R. K. (2019). Endoplasmic reticulum stress: A master regulator of metabolic syndrome. *European Journal of Pharmacology*, 860(April), 172553. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172553>
- Nakatani, Y., Kaneto, H., Kawamori, D., Yoshiuchi, K., Hatazaki, M., Matsuoka, T. A., ... Matsuhisa, M. (2005). Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), 847-851. <https://doi.org/10.1074/jbc.M41186020>
- Nandhini, A. T. A., Thirunavukkarasu, V., Ravichandran, M. K., & Anuradha, C. V. (2005). Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. *Singapore medical journal*, 46(2), 82-87.
- Oyadomari, S., & Mori, M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death and Differentiation*, 11(4), 381-389. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401373>
- Ozcan, U. (2004). Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science*, 306(5695), 457-461. <https://doi.org/10.1126/science.1103160>
- Poitout, V., & Robertson, R. P. (2002). Minireview: Secondary β -cell failure in

- type 2 diabetes—A convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology*, 143(2), 339-342. <https://doi.org/10.1210/endo.143.2.8623>
- Poitout, V., & Robertson, R. P. (2008). *Glucolipotoxicity: Fuel Excess and-Cell Dysfunction*. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0023>
- Rebolledo, A., Rebolledo, O. R., Marra, C. A., García, M. E., Roldán Palomo, A. R., Rimorini, L., & Gagliardino, J. J. (2010). Early alterations in vascular contractility associated to changes in fatty acid composition and oxidative stress markers in perivascular adipose tissue. *Cardiovascular Diabetology*, 9(1), 65. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-9-65>
- Román, C. L., Flores, L. E., Maiztegui, B., Raschia, M. A., Del Zotto, H., & Gagliardino, J. J. (2014). Islet NADPH oxidase activity modulates β -cell mass and endocrine function in rats with fructose-induced oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(12), 3475-3482. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.09.011>
- Rutkowski, D. T., & Hegde, R. S. (2010). Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *Journal of Cell Biology*, 189(5), 783-794. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003138>
- Rutkowski, D. T., & Kaufman, R. J. (2004). A trip to the ER: Coping with stress. *Trends in Cell Biology*, 14(1), 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.11.001>
- Taylor, R. (2008). Pathogenesis of type 2 diabetes: Tracing the reverse route from cure to cause. *Diabetologia*, 51(10), 1781-1789. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1116-7>
- Thorburn, A. W., Storlien, L. H., Jenkins, A. B., Khouri, S., & Kraegen, E. W. (1989). Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 49(6), 1155-1163. <https://doi.org/10.1093/ajcn/49.6.1155>
- Thounaojam, M. C., Nammi, S., & Jadeja, R. (2016). *Editorial Natural Products for the Treatment of Obesity, Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes 2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/9072345>
- Urano, F., Wang, X. Z., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 287(5453), 664-666. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.664>
- Yin, J.-J., Li, Y.-B., Wang, Y., Liu, G.-D., Wang, J., Zhu, X.-O., & Pan, S.-H. (2012). The role of autophagy in endoplasmic reticulum stress-induced pancreatic β cell death. *Autophagy*, 8(2), 158-164. <https://doi.org/10.4161/auto.8.2.18807>
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., & Tohyama, M. (2001). Activation of Caspase-12, an Endoplasmic Reticulum (ER) Resident Caspase, through Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2-dependent Mechanism in Response to the ER Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), 13935-13940. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010677200>

Financiamiento

El presente trabajo se realizó con fondos provenientes de: Subsidio básico de la Sociedad Argentina de Diabetes, Proyecto de Investigación UNLP Programa de Incentivos M232, PICT 2019 Proyecto 01956 otorgado por ANPCYT – FONCYT y PIP 11220200102546CO01 otorgado por CONICET.