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

Mecanismos celulares involucrados en la regulación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal en un modelo animal de insulinorresistencia inducida por la ingesta de carbohidratos simples

Mercau, María Elisa

2016-02-22

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:
Mercau, María Elisa. (2016-02-22). Mecanismos celulares involucrados en la regulación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal en un modelo animal de insulinorresistencia inducida por la ingesta de carbohidratos simples. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Mercau, María Elisa. "Mecanismos celulares involucrados en la regulación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal en un modelo animal de insulinorresistencia inducida por la ingesta de carbohidratos simples". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-02-22.

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 QUÍMICA BIOLÓGICA

Mecanismos celulares involucrados en la regulación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal en un modelo animal de insulinorresistencia inducida por la ingesta de carbohidratos simples

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. María Elisa Mercau

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

Consejero de Estudios: Prof. Dra. Adalí Pecci

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Endocrinología Molecular. Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. CEFyBO-CONICET

Buenos Aires, 22 de Febrero de 2016

Resumen

Diversas evidencias experimentales demostraron que el desarrollo de insulinorresistencia (IR) se acompaña de cambios en la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA) que se traducen en variaciones en los niveles sanguíneos de glucocorticoides (GC), tanto en pacientes como en modelos animales de la enfermedad. En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos un aumento en los niveles de GC en animales tratados con una dieta rica en sacarosa (DRS) durante 7 semanas que se asoció con una respuesta adrenal disminuida en la prueba de estimulación con la hormona adrenocorticotropina (ACTH).

Dado que la principal hormona reguladora de la secreción de GC es la ACTH, el objetivo central de este trabajo de tesis consistió en evaluar los efectos de la administración de DRS sobre la producción de ACTH en distintos estadios del desarrollo de IR y estudiar los mecanismos subyacentes a las alteraciones encontradas a nivel adenohipofisario. En ese marco, evaluamos los efectos del tratamiento antioxidante sobre cambios tempranos inducidos por el consumo de DRS y del ejercicio moderado como medida preventiva de los efectos de la exposición prolongada a la dieta.

Los resultados obtenidos indicaron que en el modelo animal de IR por la administración de DRS, los animales presentaron cambios en la secreción de ACTH y corticosterona. En etapas tempranas del tratamiento (3 semanas) encontramos un aumento en la actividad del eje HHA, que fue previa a la detección de cambios en la

insulinosensibilidad sistémica (evidente a partir de la séptima semana del inicio del consumo de DRS). Sin embargo, en animales tratados por períodos más prolongados (15 semanas) observamos una disminución de los niveles circulantes de ACTH y de corticosterona.

Postulamos que la hiperactivación temprana del eje podría estar asociada con la generación de estrés oxidativo a nivel adenohipofisario, dado que el tratamiento antioxidante sistémico previno tanto el aumento de marcadores de este proceso como la hipersecreción de ACTH.

La disminución en la actividad del eje HHA detectada en etapas más tardías del tratamiento podría ser consecuencia de la exposición crónica del tejido hipofisario al estrés oxidativo, inducido por concentraciones elevadas de ácidos grasos no esterificados (AGNE) circulantes, un efecto que podría ser mediado por la inducción de autofagia. Demostramos que el ejercicio moderado previno la inducción de estos procesos y la inhibición de la secreción de ACTH en animales alimentados con DRS durante 15 semanas, además de evitar el incremento de AGNE. Finalmente, estudiamos con mayor profundidad estos procesos en células adenohipofisarias en cultivo evaluando el efecto de la incubación de células de la línea AtT-20 con ácido palmítico (C16:0) y con inductores de estrés oxidativo y autofagia. Observamos que el ácido palmítico inhibió la expresión del precursor de ACTH, *Pomc*, por un mecanismo dependiente de la inducción de estrés oxidativo y de autofagia.

En suma, nuestros resultados indican que la administración de una DRS produce un incremento temprano en la expresión de *Pomc* y ACTH posiblemente mediada por la

generación de estrés oxidativo tisular. Una exposición prolongada del tejido a niveles incrementados de nutrientes, como los ácidos grasos, adicionalmente induce el proceso autofágico, lo que lleva a una hipofunción de la glándula.

Los GC afectan el metabolismo estimulando la movilización de las reservas energéticas. Sin embargo, un aumento sostenido de los niveles de estas hormonas podría contribuir al agravamiento de las características metabólicas del síndrome de IR, y precipitar la aparición de las complicaciones a largo plazo relacionadas con la enfermedad. En nuestro modelo, el estado de IR crónico se correlacionó con una inhibición de la actividad basal del eje HHA, lo que contribuiría al restablecimiento de la homeostasis metabólica. Sin embargo, también podría dar lugar a complicaciones adicionales, como la insuficiencia adrenal, afectando la respuesta del organismo frente a situaciones de estrés, lo que representaría otro factor de riesgo para los pacientes con IR.

Palabras clave:

Insulinorresistencia, eje hipotálamo-hipófiso-adrenal, ACTH (adrenocorticotrofina), POMC (proopiomelanocortina), corticosterona, estrés oxidativo, macrófagos, estrés de retículo endoplasmático, autofagia, células AtT-20, ácido palmítico, tratamientos antioxidantes, melatonina, ácido α-lipoico, ejercicio moderado.

Cellular mechanisms involved in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in an animal model of sucrose-induced insulin resistance

It has been previously described that insulin resistant (IR) individuals (humans and animals) have an altered function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), which translates into changes in their blood levels of glucocorticoids (GC). Previous studies from our group have shown that animals fed a sucrose-rich diet (SRD) for 7 weeks exhibit an increase in basal GC secretion, associated with an impairment of adrenal response to an exogenous ACTH challenge.

Given that the adrenocorticotropic hormone (ACTH) secreted by the pituitary gland is the main regulator of adrenal function, the main goal of the present study was to analyze the effect of SRD consumption on ACTH production at different stages of the development of IR, and elucidate possible underlying mechanisms operating at pituitary level. In this context, we analyzed the effects of antioxidant treatment on the early changes induced by SRD consumption, and of moderate exercise as a preventive measure to counteract the effects of prolonged exposure to SRD. Our results indicate that in the experimental model of SRD-induced IR, animals present alterations in the production and blood levels of ACTH and corticosterone. In this sense, we observed that SRD treatment induces an early hyperactivation of the HPA axis (3rd week), which was prior to the observed changes in insulin sensitivity (only evident after 7 weeks of treatment). However, as treatment progresses, prolonged SRD-consumption (15 weeks) inhibits basal HPA activity, as evidenced by lower circulating ACTH and corticosterone levels.

We propose that the early hyperactivation of the HPA axis found in SRD-treated animals could be associated with the generation of oxidative stress at pituitary level, given that systemic antioxidant treatment prevented the induction of these processes and also ACTH hypersecretion.

The impairment in HPA activity induced by long-term SRD treatment (15 weeks), could be a consequence of chronic overexposure of the pituitary tissue to increased levels of circulating non-esterified fatty acids (NEFA), which could trigger oxidative-stress induced autophagy in ACTH-producing cells. Our results show that moderate exercise prevented the induction of these cellular processes, as well as SRD-induced corticotroph dysfunction, while also normalizing NEFA levels.

In order to confirm these results, we studied the underlying mechanism in cultured corticotrophs by incubating AtT-20 cells in the presence of palmitic acid (C16:0), a main component of the NEFA fraction, or with oxidative stress and autophagy inductors. From these studies we concluded that oxidative stress generation and autophagy mediate POMC inhibition triggered by palmitic acid treatment.

Taken together, our results show that SRD administration induces an early increase in *Pomc* expression and ACTH release, possibly mediated by an increase in oxidative stress at pituitary level. Chronic exposure of pituitary tissue to an increased concentration of nutrients (e.g. fatty acids, among others) additionally induces autophagy in corticotroph cells, which could lead to inhibition of ACTH production.

Among other actions, GC affect metabolism by stimulating the mobilization of

energy stores in order to cope with increased metabolic demands. However, a sustained increase in circulating GC levels could contribute to aggravate the clinical manifestations of metabolic syndrome. In our animal model, chronic IR correlated with inhibition of basal HPA axis activity, which could help to restore metabolic homeostasis. However, this could also lead to complications, such as adrenal insufficiency, that might affect the response to stressful stimuli, representing an additional risk for patients with IR.

Keywords:

Insulin resistance, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, ACTH (corticotropin hormone), *Pomc* (proopiomelanocortin), corticosterone, oxidative stress, macrophages, ER stress, autophagy, AtT-20 cells, palmitic acid, antioxidant treatment, melatonin, α-lipoic acid, moderate exercise.

Agradecimientos

Agradecer a la gente que me acompañó en etapas tan complejas como la realización de mi tesis, queda corto en múltiples sentidos. La sensación de agradecimiento muta hacia una sensación de ofrenda, del trabajo realizado y de los logros alcanzados. Pongo en las manos de mis viejos todo eso.

A mi mamá, Marta, que me puso a pipetear desde chiquita, y que desde entonces abrió un nuevo canal en el vínculo madre-hija, atravesado por la ciencia y el amor hacia ella. A mi papá, Martín, que me enseñó entre otras cosas que el amor por lo que uno hace trasciende las distancias y los tiempos. A mis hermanas, Guille y Ro, que son ejemplos vivos de que hemos sido criadas en total libertad de elección, con apoyo incondicional y sostén a cada paso. Gracias hermanas por ser el viento que empuja este barrilete.

Todo esto hubiera sido imposible sin mis abuelos, en particular Pichi y Alfredo, que estuvieron y están siempre presentes en mis días. A Pichi por el amor infinito y el puré tricolor con huevo duro; a Alfredo por la entrega y la dedicación a mejorar los días de todos los que lo rodeaban.

A mis amigos de toda la vida, en particular a Azu y Pablo, los mejores, quienes con su arte y su amor hicieron de mí una persona más completa. A Lucio y a Homer, que los quiero como si fueran mis hermanos.

En el transcurso de la realización de este trabajo, pasaron muchas cosas, además de tiempo. Fundamentalmente, aprendí a sobrellevar esta relación turbulenta que uno tiene con su profesión, y volví a enamorarme de la biología. Agradezco a mi directora, Cora Cymeryng, por que fue ella quien me transmitió la importancia de ponerle entrega y dedicación a nuestro trabajo (a pesar de que muchas veces el

objetivo parezca imposible de alcanzar), y de cuidar los logros conseguidos. Gracias a tu amistad y generosidad, mi formación trascendió lo científico y lo profesional. Espero que me extrañes; yo, seguro, lo voy a hacer.

A quienes hoy llamo con orgullo mis colegas, mis hermanos de la ciencia, Paco, Cami y Martín, que compartieron mis primeros pasos científicos y con quienes siempre estaré profundamente agradecida. Ellos me enseñaron a trabajar en equipo, que es lo que más me gusta de esta profesión. A los más jóvenes del labo, quienes me permitieron formar parte de su aprendizaje y me llenan de orgullo y mates: en particular a Mati y a Salva, por obligarme a aprender para estar a la altura de enseñarles (fue todo un desafío, son demasiado grosos). A todos los *lemmings* que pasaron por el LEM en estos años y que se dejaron contagiar un poquito de las ganas de jugar a hacer ciencia. Gracias a Silvia, también, por meter el arte en el laboratorio y por todo lo compartido.

A Ruth Rosenstein, directora del NROE, y a todo su equipo (presente y pasado), por haber formado parte cotidiana de mi vida, y transmitirme lo que significa tirar todos para el mismo lado. Gracias, Ruth, por tu generosidad y amistad. Este vínculo me deja amigos y colegas imprescindibles en mi vida: Diego, Nuri, Nico, Maga, Dami, Eze, Pablito y Meli (el viejo *dream team*, con los que compartimos innumerables discusiones y momentos felices), quienes son objeto de gran admiración en mi vida y me siguen acompañando todos los días, en la mayoría de los casos a la distancia. Marquitos, Florcita y Hernán (el presente y futuro del NROE, y grandes amigos que me llevo), merecerían un capítulo aparte. Gracias por contagiarme de buena onda y, sobre todo, por el apoyo mutuo de todo este último tiempo. A Inés y Moni, no tengo palabras para agradecerles los mimos y la compañía, son las *mamás* de todos nosotros.

A Adalí Pecci, mi consejera de tesis en los papeles, pero un gran apoyo desde

tiempos de la licenciatura. Gracias por las risas y por los consejos de siempre.

A Carla Finkielstein, gracias por recibirme en su laboratorio y hacerme sentir parte durante mi estadía en Virginia Tech. Esta tesis está atravesada por tu amistad, generosidad y colaboración.

A todo el CEFyBO, y en particular a su directora Ana Franchi y a su grupo, que siempre estuvieron dispuestos a colaborar. Una mención especial a Enzo, nuestro bioterista estrella, que trasmitió el cariño por el cuidado de los animales que forman parte de esta tesis.

Al Departamento de Bioquímica Humana de la Facultad de Medicina de la UBA, por formarme como docente, y por darme el lugar para realizar este trabajo de investigación.

A las instituciones públicas que financiaron esta tesis: Universidad de Buenos Aires, CONICET y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

A mi país y a su pueblo, que me dio la oportunidad de formarme en una universidad estatal, pública y gratuita.

Publicaciones y presentaciones a congresos

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

Publicaciones:

- "*Moderate exercise prevents functional remodeling of the anterior pituitary gland in diet-induced insulin resistance in rats: role of oxidative stress and autophagy"* – **Mercau ME**; Repetto EM; Perez MN; Martinez Calejman C; Sanchez Puch S, Finkielstein CV, Cymeryng CB

  Endocrinology 2016 – En prensa. doi: 10.1210/en.2015-1777

- *"Melatonin treatment prevents dysregulation of the pituitary production of Pomc and ACTH induced by a sucrose-rich diet"*

  Mercau ME, Perez MN, Calanni JS, Aranda ML, Sanchez Puch S, Vecino CV, Repetto EM, Rosenstein RE, Cymeryng CB

  Manuscrito en preparación

Presentaciones a congresos:

2015:

- *Presentación Oral: "Hiperactivación temprana del eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal inducida por una dieta rica en sacarosa: Rol del estrés oxidativo y la inflamación. Pérez, MN*, **Mercau, ME*;** Repetto EM, Calanni JS, Aranda ML, Cymeryng CB. *Ambos autores contribuyeron de igual manera al trabajo.*

  Reunión Anual SAIC – SAFIS. Mar del Plata, Argentina.

- *Presentación oral: "Autophagy And Oxidative Stress Contribute To The Functional Remodeling Of The Anterior Pituitary Gland In Diet-Induced Insulin Resistance". **Mercau ME**; Repetto EM; Calanni JS; Bogni E; Vecino C; Caldareri L; Finkielstein CV; Cymeryng CB.*

3rd South American Symposium in Signal Transduction and Molecular Medicine (SISTAM). Bariloche, Argentina.

- *Poster: "Moderate exercise prevents pituitary dysfunction induced by a sucrose rich diet".* ***M.E. Mercau****, E. Repetto, P. Arias, C.V. Finkielstein, C.B. Cymeryng*

  51th Annual EASD Meeting (European Association for the Study of Diabetes). Estocolmo, Suecia.

2014:

- *Presentación oral: "Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy Contribute to the Functional Remodeling of the Anterior Pituitary Gland in Diet-Induced Insulin Resistance".* ***Mercau ME****, Repetto EM, Perez MN, Martinez Calejman C, Sanchez R, Olejarczyk JM, Finkielstein CV, Cymeryng CB*

  Endocrine Society Annual Meeting. Chicago, EEUU.

2013

- *Poster: "Alteraciones del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA) en un modelo animal de insulinorresistencia inducido por dieta rica en sacarosa". *Perez MN, ****Mercau ME****, Sanchez R, Martinez Calejman C, Caldareri L, Repetto EM, Arias P, Cymeryng CB - . *Ambos autores contribuyeron de igual manera al trabajo.*

  Reunión Anual SAIC – SAFIS. Mar del Plata, Argentina.

2012

- *Poster: "Moderate exercise prevents functional changes in the anterior pituitary of rats with high sucrose diet-induced insulin resistance".* ***Mercau ME****, Giordanino EF, Martinez Calejman C, Sanchez R, Arias P; Cymeryng CB*

  Reunión Anual SAIC – SAFIS. Mar del Plata, Argentina.

Acrónimos y abreviaturas utilizadas en este trabajo:

ACTH: hormona adrenocorticotrofina

AGNE: ácidos grasos no esterificados

AH: adenohipófisis

ALA: ácido α-lipoico

AKT: proteína quinasa B

AVP: arginina-vasopresina

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

CO: monóxido de carbono

CRH: hormona liberadora de corticotrofina

DFC-DA: diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína

DRS: dieta rica en sacarosa

DMT2: *diabetes mellitus* tipo 2

E: ejercicio moderado

eje HHA: eje hipotálamo-hipófiso-adrenal

EOx: estrés oxidativo

EROs: especies reactivas del oxígeno

GC: glucocorticoides

GLUT-4: isoforma 4 del transportador de glucosa

Grp78: Proteína de 78 kDa regulada por glucosa (*78 kDa glucose-regulated protein)*

HO: hemo oxigenasa

IR: insulinorresistencia

IRS: sustrato del receptor de insulina

MAPK: quinasa de proteínas activadas por mitógenos

MEL: melatonina

MC2R: receptor de melanocortina tipo 2

NAC: *N*-acetil cisteína

NO: óxido nítrico

NPV: núcleo paraventricular

$p58^{IPK}$: Inhibidor de 58 kDa de proteína quinasa (*Protein Kinase Inhibitor Of 58kDa)*

PKA: proteína quinasa A

Pomc: Proopiomelanocortina (gen)

POMC: Proopiomelanocortina (péptido)

RE: retículo endoplasmático

S: sedentario

StAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

TAG: triacilglicéridos

TNF- α: factor de necrosis tumoral α

UPR: respuesta a proteínas mal plegadas (*unfolded protein response*)

ZF: *zona fasciculata*

Índice

Resumen **2**

Abstract ..... Error! Bookmark not defined.

Agradecimientos **8**

Publicaciones y presentaciones a congresos **11**

Introducción **18**

1. Eje hipotálamo-hipófiso adrenal **18**

1.1 Síndrome general de adaptación **18**

1.2 Hipófisis - Características generales **20**

1.3 Tipos celulares que integran la pars distalis hipofisaria **23**

1.4 Conexión anatómica y funcional con el hipotálamo: el sistema porta hipotálamo-hipofisario **25**

1.5 Síntesis y secreción de la hormona corticotropina (ACTH) **26**

1.6 Regulación de la síntesis y secreción de glucocorticoides por ACTH **29**

1.7 Efectos metabólicos de los glucocorticoides **32**

1.8 Otros efectos de los glucocorticoides **35**

2 . El síndrome de resistencia a insulina **37**

2.1 Insulina **37**

2.1 Vías de transducción de señales activadas por la insulina **39**

2.2 Resistencia a la insulina **41**

2.2.1 Definiciones, características y prevalencia 41

2.2.2 Etiopatogenia de la IR 42

2.2.3 Procesos asociados a la IR: estrés oxidativo (EOx) 44

2.2.4 Procesos asociados a la IR: inflamación 50

2.2.5 Procesos asociados a la IR: estrés de retículo endoplasmático y autofagia 51

2.3 Modelos animales de IR **56**

2.4 Intervenciones terapéuticas para el tratamiento de la IR: ejercicio físico **59**

3. Relación entre la regulación del eje HHA y la homeostasis de la glucosa **63**

Objetivos **66**

Materiales y métodos **67**

Materiales **67**

Animales y diseño experimental **68**

Test de tolerancia a la insulina (TTI) **71**

Obtención de plasma y suero. Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales. **72**

Determinaciones de parámetros de estrés oxidativo y defensa antioxidante **73**

a. Determinación de generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) en cultivos celulares 73

b. Determinación de parámetros de estrés oxidativo y defensa antioxidante en adenohipófisis 73

Obtención de ARN total y determinación de niveles de ARNm **75**

Determinación de niveles de expresión de proteínas **76**

Inmunofluorescencia en tejido adenohipofisario **77**

Cultivos celulares **80**

a. Ensayos utilizando plásmidos reporteros de la actividad del promotor de Pomc 81

b. Ensayos utilizando plásmidos de expresión de la proteína de fusión pRFP-LC3 82

c. Tratamientos 82

Análisis estadístico **85**

Resultados **86**

Parte I: Efectos de la administración de DRS sobre la actividad del eje HHA **86**

Parte II: Estudio de los efectos tempranos del tratamiento con DRS sobre la función del eje HHA **93**

I) Efecto del tratamiento con DRS sobre la función adenohipofisaria 93

II) Efecto del tratamiento con ácido α-Lipoico (ALA) sobre la función adenohipofisaria de ratas tratadas con DRS 99

III) Efecto del tratamiento con Melatonina sobre la sobre la función adenohipofisaria de ratas tratadas con DRS. 105

IV) Estudio de mecanismos regulatorios de la expresión de Pomc en células AtT-20: Rol del estrés oxidativo y la inflamación. 110

Parte III: Estudio de los efectos del consumo prolongado de DRS sobre el eje HHA 116

I) Efecto del tratamiento con DRS sobre la función adenohipofisaria 116

II) Efecto del ejercicio moderado sobre la sobre la función adenohipofisaria de ratas tratadas con DRS. 121

III) Efecto de la inducción de estrés oxidativo y autofagia sobre los niveles de expresión de Pomc/ACTH en la línea celular AtT-20 127

IV) Efecto del ácido palmítico sobre los niveles de expresión de Pomc/ACTH en células AtT-20 130

Discusión 137

Curso temporal de los efectos del consumo de DRS sobre el eje HHA 139

Efectos tempranos del consumo de DRS sobre la función adenohipofisaria 143

Efecto del consumo prolongado de DRS sobre la actividad del eje HHA 150

Perspectivas a futuro 157

Bibliografía 159

Introducción

1. Eje hipotálamo-hipófiso adrenal

1.1 Síndrome general de adaptación

El eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA) ha sido objeto de estudio desde principios del siglo XX. En los años 30, Walter Cannon denominó "respuesta de lucha o huida (*fight or flight)*" al conjunto de mecanismos fisiológicos que se ponen en juego al reaccionar ante una situación potencialmente peligrosa. Esta respuesta está intrínsecamente asociada a la activación de la rama simpática del sistema nervioso autónomo que, mediante la liberación de adrenalina, genera cambios en el flujo sanguíneo, la glucemia y la coagulación, entre otros [1]. A su vez, la activación del eje HHA, que interviene en el control de la homeostasis energética, favorece la disponibilidad de los sustratos necesarios para este comportamiento.

Años más tarde, Hans Selye propuso la participación de la corteza adrenal y de los glucocorticoides (GC) en la respuesta general al estrés, independientemente de la naturaleza del estresor, en lo que definió como el "*síndrome general de adaptación*" [2]. Selye propuso la existencia de 3 etapas en la respuesta de adaptación del organismo: en primer lugar, la *reacción de alarma,* que incluye un aumento generalizado de la respuesta simpática, con una liberación rápida de adrenalina de la médula adrenal seguida de un aumento en la secreción de GC. La siguiente etapa es la *fase de la resistencia*, y se caracteriza por un aumento sostenido en la secreción de GC e hipertrofia adrenal (principalmente de la *zona fasciculata*) en respuesta a

niveles elevados de ACTH. Durante esta etapa, el organismo intenta adaptarse a la presencia continua del estresor. Finalmente, si el estímulo persiste, el organismo puede ingresar a la *fase final de agotamiento*, en la que se ve impedida la habilidad del eje HHA de funcionar normalmente. De sostenerse en el tiempo, una respuesta que involucre niveles suprafisiológicos de GC circulantes podría ocasionar pérdida de peso, una disminución de la actividad reproductiva y la supresión de la respuesta inmune. Aunque Selye sugiere que el agotamiento del eje HHA cumple un rol central en esta última etapa, en general se reconoce que esta etapa del síndrome de adaptación está relacionada al debilitamiento general del organismo (generado por la hiperglucemia sostenida, la neurodegeneración y la supresión inmune) que puede llevar a la muerte [3].

La activación del eje HHA a corto plazo es una respuesta adaptativa esencial, ya que los efectos metabólicos y comportamentales que resultan de la misma permiten al organismo reaccionar ante un estímulo estresor. Una evidencia de esto es el alto grado de conservación de este eje, cuya historia evolutiva comenzó cerca de 400 millones de años atrás en el *phylum* de los vertebrados, y da testimonio de su gran valor adaptativo como efector de la respuesta al estrés.

Se puede considerar que la actividad del eje del estrés, como comúnmente se conoce al eje HHA, es la resultante de un conjunto complejo de influencias directas y de retroalimentación entre 3 tejidos endócrinos: el núcleo paraventricular hipotalámico, la adenohipófisis (células corticotropas) y la corteza adrenal (células esteroidogénicas). Las neuronas magnocelulares del núcleo paraventricular (NPV) hipotalámico proyectan sus terminales al sistema porta hipotálamo-hipofisario y, en

respuesta a situaciones de estrés, liberan hormonas que modulan la función hipofisaria. En particular, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) producida por el NPV actúa sobre los corticotropos de la *pars distalis* hipofisaria, modulando la síntesis y liberación de adrenocorticotropina (ACTH) principal hormona reguladora de la esteroidogénesis adrenal.

En este trabajo de tesis nos concentramos en el estudio de la función hipofisaria en el contexto del desarrollo de insulinorresistencia, inducida por la ingesta de dietas ricas en carbohidratos simples.

1.2 Hipófisis - Características generales

La hipófisis es una glándula endócrina que responde a estímulos centrales (factores liberadores hipotalámicos) y sistémicos (citoquinas) liberando hormonas que modulan la función de múltiples tejidos. Este órgano complejo se sitúa en posición ventral respecto del diencéfalo, inmediatamente posterior al quiasma óptico en mamíferos adultos, y está alojado en una depresión ósea situada en el hueso esfenoides denominada *silla turca*. Esta estructura se encuentra anatómicamente asociada al hipotálamo mediante el tallo hipofisario. Desde el punto de vista embriológico, la hipófisis puede dividirse en dos estructuras: la adenohipófisis y la neurohipófisis (Figura 1). Estas dos porciones, estructural y funcionalmente distintas, son de origen ectodérmico y neural respectivamente.

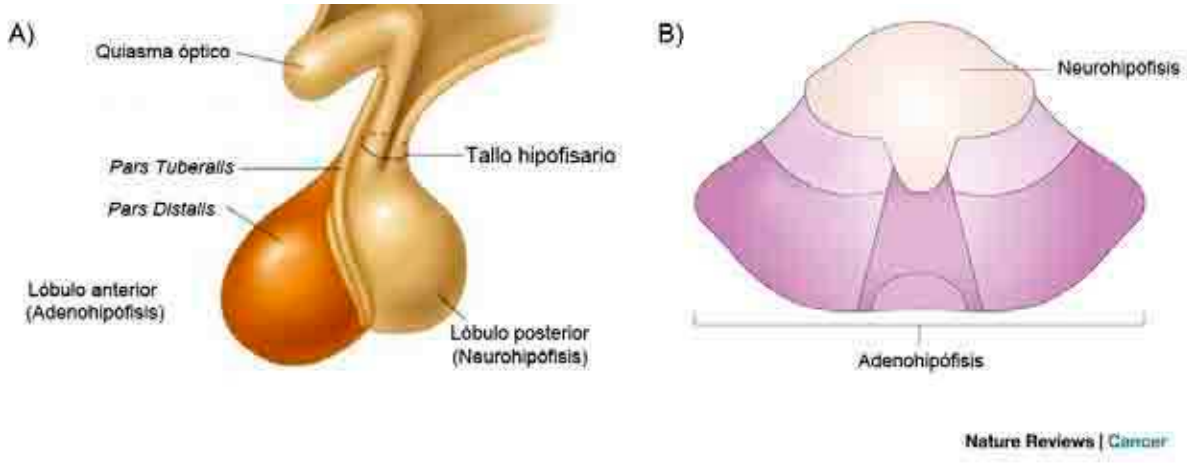


***Figura 1:* Comparación esquemática entre la hipófisis humana y la hipófisis de rata.** A) Esquema de hipófisis de humano. B) Esquema de hipófisis de rata, modificado de Heaney *et al.* [4].

La adenohipófisis se origina a partir de una evaginación del epitelio de la cavidad bucal, denominada *bolsa de Rathke*, mientras que la neurohipófisis tiene su origen en una evaginación de la base del diencéfalo, el infundíbulo neural [3] (Figura 2).

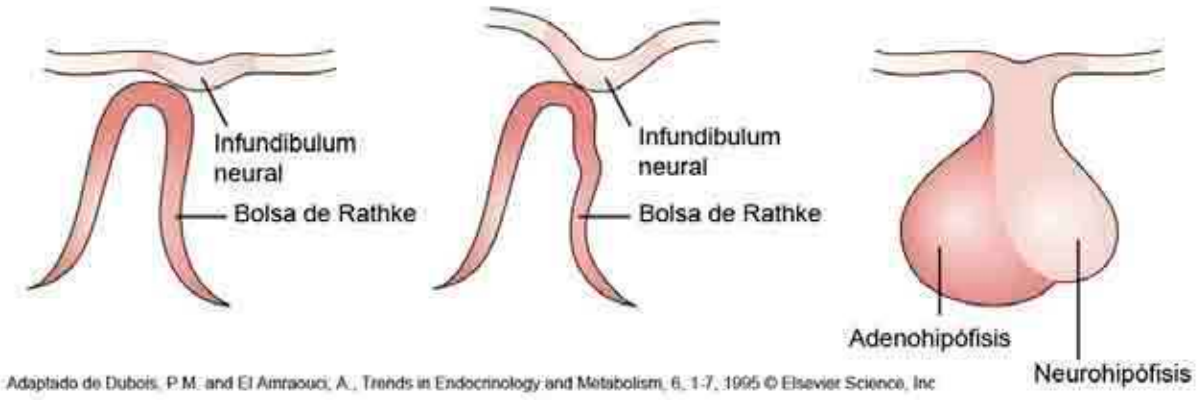


***Figura 2:* Desarrollo hipofisario.** La adenohipófisis se origina a partir de una evaginación epidérmica de la *bolsa de Rathke*, y la neurohipófisis del infundíbulo neural. La *pars intermedia* se desarrolla en el punto de contacto entre estas dos evaginaciones [3].

Pueden considerarse tres regiones diferentes en la adenohipófisis adulta:

El lóbulo tuberal (*pars tuberalis*) es característico de todos los tetrápodos, pero poco se sabe de su rol en la fisiología. Junto con la eminencia media, forma el tallo hipofisario. Este tejido está constituido por células que sintetizan hormonas tróficas (se ha observado inmunoreactividad para ACTH, FSH and LH), razón por la cual fue considerado una prolongación de la *pars distalis*, principalmente asociado a funciones reproductivas [3].

El lóbulo intermedio (*pars intermedia*), presenta un desarrollo muy variable a lo largo de la evolución en los diferentes grupos de animales. Está compuesto por células que expresan el péptido proopiomelanocortina (POMC), y se lo ha asociado fundamentalmente con la producción de la hormona estimulante de melanocitos (MSH), y con el control de la pigmentación [5]. La hipófisis de algunos mamíferos, en particular los seres humanos, carece de este lóbulo.

El lóbulo anterior de la adenohipófisis, o *pars distalis*, está integrado por diversos tipos celulares especializados en la producción de diferentes hormonas. Produce hormonas peptídicas que regulan la actividad de glándulas endócrinas periféricas (por ejemplo, la glándula tiroides, las gónadas o la corteza suprarrenal) además de contribuir con otras funciones homeostáticas de los organismos (balance hidrosalino, pigmentación de la piel, parto y lactancia, etc.) [3].

La neurohipófisis de los mamíferos está constituida fundamentalmente por la eminencia media y la *pars nervosa*. Ambas estructuras están compuestas por capilares, pituicitos (similares a los astrocitos del sistema nervioso central) y terminales axonales de neuronas provenientes de diferentes núcleos hipotalámicos.

En la *pars nervosa* se encuentran las terminales axonales provenientes de los núcleos hipotalámicos supraóptico (NSO) y paraventricular (NPV), que secretan las hormonas antidiurética (ADH) y oxitocina respectivamente. Estas hormonas son almacenadas en vesículas en las terminales nerviosas y se liberan cerca del plexo primario hipofisario en respuesta a estímulos hipotalámicos.

1.3 Tipos celulares que integran la *pars distalis* hipofisaria

Utilizando diferentes técnicas histológicas, se ha demostrado que existe un tipo celular responsable de la síntesis y liberación de cada hormona trófica hipofisaria.

Somatotropos: Son el tipo celular más abundante de la *pars distalis* de mamíferos, representando cerca del 50% de las células de la misma. Este tipo celular se distribuye fundamentalmente en los márgenes de la *pars distalis,* y es responsable de la liberación de la hormona de crecimiento (GH).

Tirotropos: Presentan largos procesos citoplasmáticos y contienen gránulos secretorios esféricos. Están principalmente localizados en la porción medial de la *pars distalis*, y no presentan grandes variaciones poblacionales con la edad y el sexo. Los tirotropos son responsables de la síntesis y liberación de la hormona tirotropina (TSH), que actúa sobre la glándula tiroides y modula la síntesis de las hormonas tiroideas.

Gonadotropos: Representan alrededor del 15% de las células de la *pars distalis*, y se distribuyen homogéneamente en este tejido. Existen al menos 3 subtipos en esta población: los responsables de la síntesis de la hormona folículo estimulante (FSH), aquéllos que sintetizan la hormona luteinizante (LH) y los que son capaces de

producir ambas hormonas. Ambos mensajeros químicos modulan la función de las gónadas.

Lactotropos: Responsables de la síntesis de prolactina (PRL), constituyen entre el 10% y el 25% del total de las células adenohipofisarias de mamíferos. Presentan variaciones de número respecto del sexo y la edad reproductiva (están menos representadas en machos, en hembras nulíparas y en mamíferos juveniles).

Corticotropos: Son los responsables de la producción y liberación de la hormona corticotropina (ACTH), y se localizan centralmente en la *pars distalis.* Representan entre el 10% y el 15% de las células adenohipofisarias. Contienen gránulos secretorios inmunoreactivos para los diferentes productos de clivaje (ACTH, LPH y β-endorfinas) del precursor proteico POMC. Este tipo celular no presenta variaciones en número respecto de la edad y el sexo pero puede variar significativamente en estados patológicos.

En la adenohipófisis también se ha descripto la presencia de células denominadas "células folículoestrelladas hipofisarias", que presentan características similares a las de la glía del sistema nervioso central, y que cumplen funciones de soporte y/o nutricionales. Se ha postulado que estas células participan en el remodelado del tejido, funcionando como *scavengers* fagocíticos y también se ha demostrado que sus productos de secreción podrían modular la síntesis y liberación de las hormonas adenohipofisarias [3].

1.4 Conexión anatómica y funcional con el hipotálamo: el sistema porta hipotálamo-hipofisario

La conexión entre el hipotálamo y los lóbulos hipofisarios se da a través de dos órganos neurohemales característicos e independientes: la eminencia media (EM) y la *pars nervosa*.

La arteria superior hipofisaria desemboca en los capilares de la EM, que a su vez conectan con los vasos portales hipotalámicos atravesando desde la *pars tuberalis* a la *pars distalis*, donde los factores de liberación hipotalámicos estimulan la secreción de hormonas tróficas adenohipofisarias. Los diferentes núcleos hipotalámicos que descargan en el sistema porta son: los núcleos arcuato (ARC), dorsomedial (DMN), paraventricular (PVN), supraóptico (SON), y ventromedial (VMN) y el área preóptica (POA). El PVN modula la función de los corticotropos y los tirotropos, mediante la liberación de CRH (hormona liberadora de corticotropina) y TRH (hormona liberadora de tirotropina), respectivamente. La liberación de dopamina (DA) y GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) desde el ARC modula la función de los lactotropos y los gonadotropos adenohipofisarios, respectivamente (Figura 3) .

Por otro lado, la *pars nervosa* almacena péptidos hipotalámicos (Arginina-vasopresina, AVP; oxitocina) y los libera por un circuito sanguíneo independiente hacia la circulación general (Figura 3) [3].

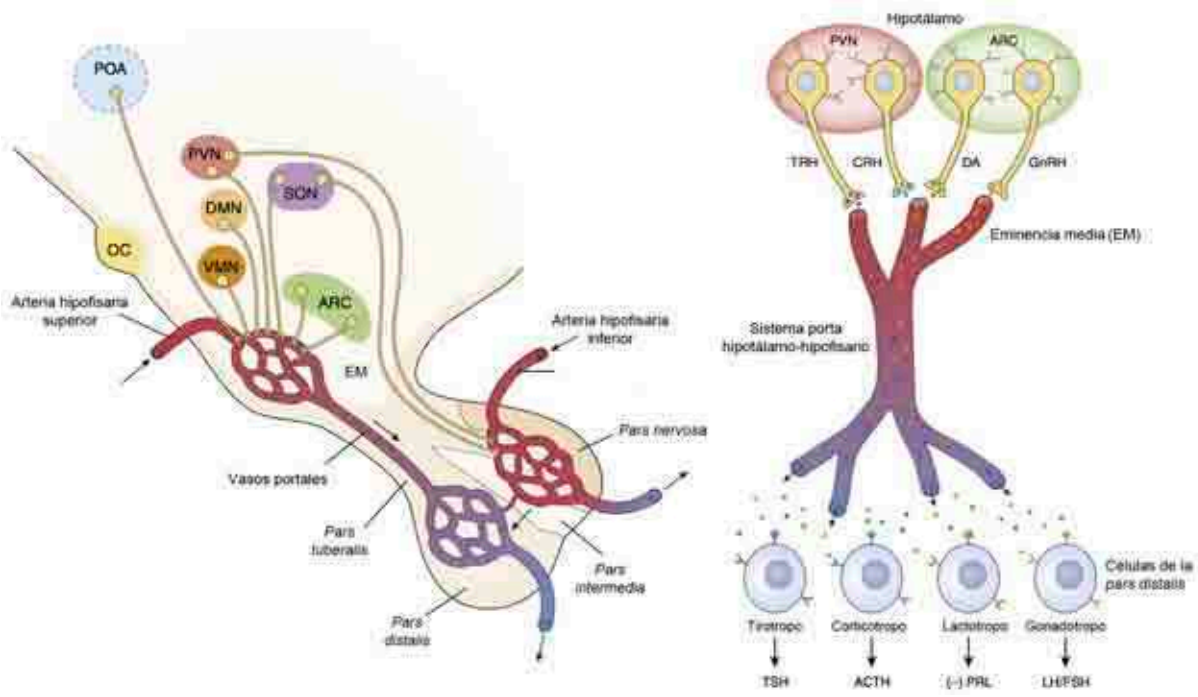


***Figura 3:* Esquema del eje hipotálamo-hipofisario (Adaptado de Norris et al. [3]).** POA: área preóptica, PVN: núcleo paraventricular; DMN: núcleo dorsomedial; SON: núcleo supraóptico; OC: quiasma óptico; VMN: núcleo ventromedial; ARC: núcleo arcuato; EM: eminencia media; TRH: hormona liberadora de tirotropina; CRH: hormona liberadora de corticotropina; DA: dopamina; GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas; TSH: tirotropina (hormona estimulante de la glándula tiroides); ACTH: hormona adrenocorticotropina; PRL: prolactina; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona folículo estimulante.

1.5 Síntesis y secreción de la hormona corticotropina (ACTH)

La hormona peptídica ACTH (39 kDa), se genera en los corticotropos de la *pars distalis* adenohipofisaria a partir del clivaje del precursor POMC. El procesamiento proteolítico de POMC da origen a diversas hormonas tróficas, dependiendo del tipo celular en estudio, como consecuencia de la expresión diferencial de dos enzimas conocidas como convertasas de pro-hormonas de tipo 1/3 (PC1/3) y de tipo 2 (PC 2) en los diferentes tipos celulares que expresan POMC (Figura 4). El precursor

POMC presenta sitios de reconocimiento y corte por estas enzimas. Como se esquematiza en la figura 4, los diferentes péptidos derivados de POMC se producen en función de la combinación de las convertasas que se expresan en cada tipo celular. En particular, en los corticotropos de la *pars distalis* se expresa exclusivamente la isoforma PC 1/3, que cliva POMC y genera un péptido de 16 kDa cuya función es desconocida, el péptido ACTH, de 39 aminoácidos y las β-lipotropinas (β-LPH), precursores de las β-endorfinas [3].

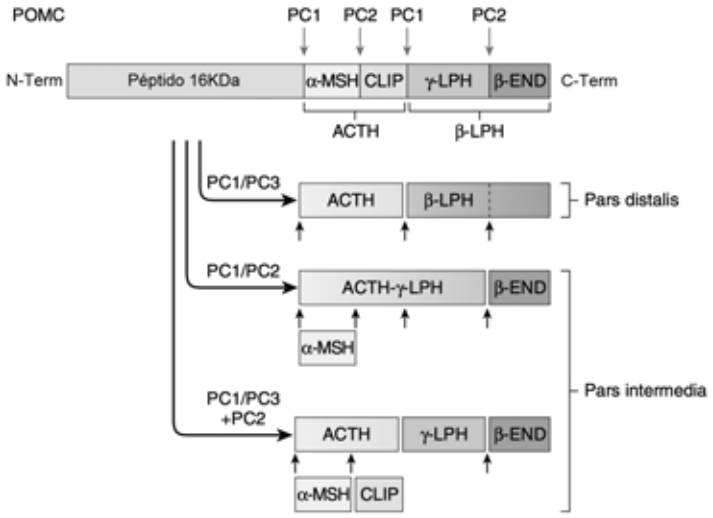


Figura 4: ***Clivaje diferencial del péptido POMC, según el tejido y la expresión de diferentes enzimas pro-hormona convertasas.*** POMC: proopiomelanocortina; PC1: pro-hormona convertasa 1; PC2: pro-hormona convertasa 2; α-MSH: hormona melanocito-estimulante α; CLIP: corticotropin-like intermediate peptide; LPH: lipotropina; β-END: β-endorfina. Adaptado de Norris [3].

Como se mencionó en la sección anterior, la hormona hipotalámica CRH es el principal factor que modula la síntesis y secreción de ACTH en los corticotropos de la hipófisis anterior. El péptido CRH, de 41 aminoácidos, fue aislado y caracterizado por primera vez por el grupo de Vale en 1981 [6]. En 1983, el mismo grupo

confirmó que la liberación de ACTH inducida por ciertos tipos de estrés era mediada no sólo por la liberación de CRH hipotalámica, sino que también involucraba los efectos del péptido arginina-vasopresina (AVP) y de las catecolaminas [7]. Posteriormente, se demostró que la AVP es un potente agente sinérgico de la respuesta a CRH, pero que tiene un efecto débil por sí misma [8]. El efecto de CRH sobre la síntesis y secreción de ACTH se da principalmente a través de su receptor de tipo I (CRHR1), que pertenece a la familia de receptores de tipo GPCRs (receptores acoplados a proteínas G). La unión de CRH a su receptor (CRHR1) hipofisario induce la activación de la enzima adenilato ciclasa mediada por la proteína Gs y el aumento de los niveles de AMPc intracelulares, activando la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) [9]. Se ha descripto que la estimulación de la PKA lleva a la inducción de los factores de transcripción Nurr77 y Nurr1. Por otro lado, la PKA estimula la apertura de canales de calcio en la membrana plasmática y esto induce la activación de la vía de Raf /Mek /ERK, por un mecanismo que involucra a la enzima calcio-calmodulina quinasa (CAMKII) y que lleva a la fosforilación y transactivación de Nurr77. Tanto Nurr1 como Nurr77 son factores de transcripción implicados en la inducción de *Pomc* frente al estímulo por CRH [10].

El efecto que ejercen los GC sobre la síntesis y secreción de ACTH es un ejemplo clásico del mecanismo de *feedback* negativo. Esto ocurre tanto a nivel de los corticotropos de la *pars distalis* hipofisaria (inhibiendo la expresión de POMC), como a nivel hipotalámico, actuando sobre la liberación de CRH y cerrando así la respuesta del eje HHA ante un estímulo agudo. A nivel hipofisario, se ha descripto

que la interacción del receptor de GC (GR) con el sitio nGRE presente en el promotor de *Pomc* inhibe su transcripción. Por otro lado, el GR es capaz de transreprimir la actividad de los factores de transcripción Nurr, mencionados anteriormente [11].

Este efecto de los GC es modulado por el estrés oxidativo (EOx), que inhibe el *feedback* negativo de los GC, evitando la translocación del GR al núcleo y modulando así la síntesis de ACTH [12].

1.6 Regulación de la síntesis y secreción de glucocorticoides por ACTH

La hormona ACTH es el principal factor regulador de la función corticoadrenal. Su receptor (MC2R) pertenece a la familia de los GPCR, y su expresión se da principalmente en las células esteroidogénicas de la corteza adrenal, aunque también se ha descripto en tejido óseo, adiposo subcutáneo y en la piel [13]. La unión de ACTH a su receptor en las células esteroidogénicas de la *zona fasciculata* (ZF) adrenal lleva a un incremento en los niveles de AMPc intracelulares y a la activación de la PKA, acelerando la síntesis y secreción de GC (principalmente cortisol en humanos y corticosterona en roedores). El transporte de colesterol al interior de la mitocondria, paso regulatorio principal de la esteroidogénesis, precisa de un conjunto coordinado de interacciones proteína-proteína, que involucra, entre otras, a las proteínas StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) y TSPO (*mitocondrial translocator protein*) [14].

Una vez ingresado a la membrana mitocondrial interna, el colesterol es transformado en pregnenolona por acción del citocromo P450 11A1 (CYP11A1, también conocido como citocromo p450scc *o cholesterol side-chain cleavage*, y antiguamente desmolasa). La pregnenolona a su vez, es transportada al retículo

endoplasmático liso, donde se convierte en progesterona (en una reacción catalizada por la enzima *3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa,* 3β-HSD) o en 17-hidroxi-pregnenolona (a través de la actividad de CYP17A1) y luego en 17-hidroxiprogesterona (3β-HSD). Luego de su hidroxilación en el C21 (por la enzima 21-hidroxilasa o CYP21) los productos del metabolismo de la progesterona y de la 17-hidroxiprogesterona (deoxicorticosterona y el 11-deoxicortisol, respectivamente) se transfieren nuevamente a la mitocondria donde, mediante la actividad de la enzima 11-β hidroxilasa (o CYP11B1), dan lugar a la síntesis de corticosterona y cortisol, respectivamente. En las células de la *zona glomerulosa* adrenal, la corticosterona sufre una transformación adicional que la convierte en aldosterona (mediante la actividad de la aldosterona sintasa o CYP11B2), mientras que la 17-hidroxipregnenolona y la 17-hidroxiprogesterona son precursoras de andrógenos en células de la *zona reticularis.* La figura 5 resume los pasos de síntesis de las diferentes hormonas derivadas del colesterol, y señala la localización subcelular de cada paso enzimático involucrado.

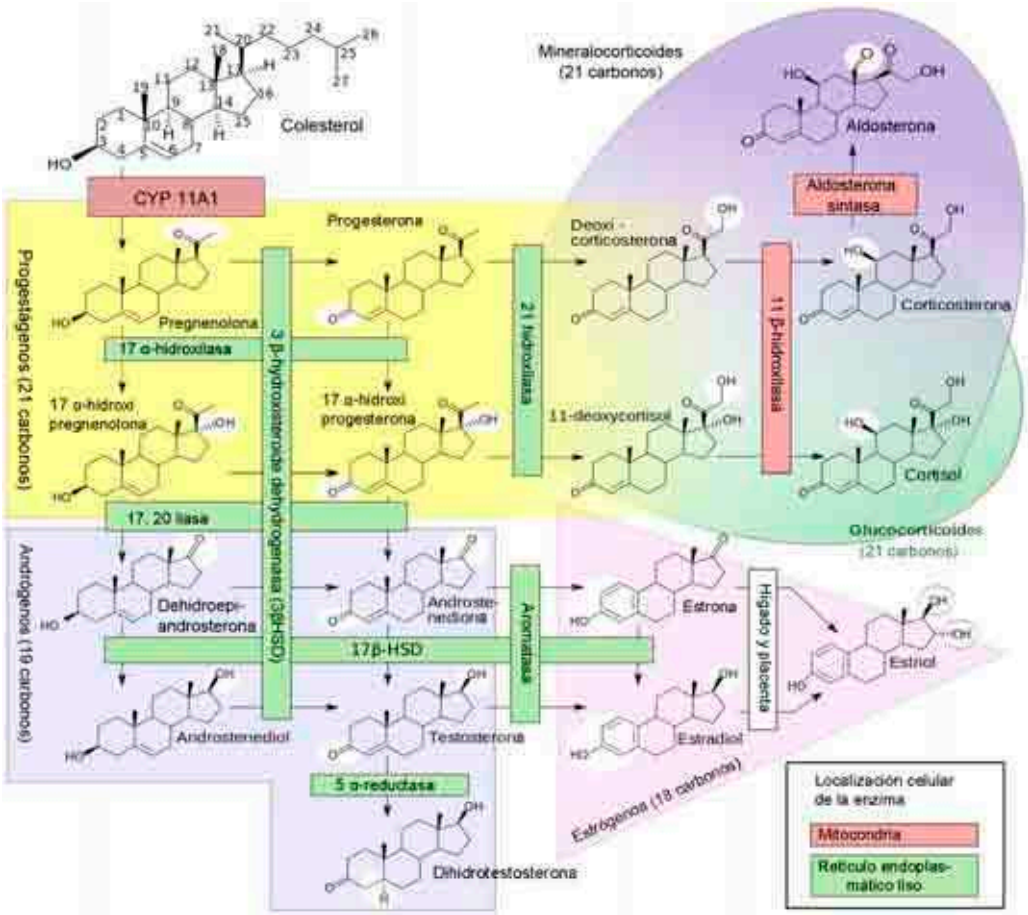


Figura 5: ***Vías de síntesis de diferentes esteroides.*** La conversión de colesterol puede llevar a diferentes tipos hormonales, dependiendo el tejido donde se realice la esteroidogénesis. Las enzimas involucradas en la síntesis de los diferentes tipos de esteroides se expresan en mitocondrias (rojo) o en retículo endoplasmático liso (verde).

Los efectos de la ACTH sobre las células de la ZF pueden clasificarse en efectos inmediatos, mediatos y a largo plazo. Mientras que la exposición crónica a niveles aumentados de ACTH resulta en la hipertrofia e hiperplasia de la corteza adrenal, en forma aguda (minutos) 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 [15]. En el mediano plazo (horas), ACTH induce también la expresión de

StAR junto con la de enzimas involucradas en la esteroidogénesis en la glándula adrenal, incrementando así la síntesis de GC.

Si bien la ACTH es la principal hormona reguladora de la esteroidogénesis adrenal, este proceso es modulado en forma directa por un conjunto variado de factores humorales o generados a nivel local. En ese sentido, en trabajos previos de nuestro grupo demostramos los efectos modulatorios negativos asociados a la actividad de las hemo oxigenasas [16] y las óxido nítrico sintasas (NOS) [17]. En el marco de la endotoxemia (tratamiento con LPS) demostramos también la regulación positiva de la esteroidogénesis por el sistema de las ciclooxigenasas (COX) tanto en condiciones basales como luego de la estimulación con ACTH [18].

ACTH también tiene efectos sobre las zonas *glomerulosa* y *reticularis* estimulando la producción de mineralocorticoides y de andrógenos adrenales, respectivamente.

La síntesis y liberación de los esteroides suprarrenales son procesos que se dan en conjunto, ya que al ser hormonas esteroideas de naturaleza lipídica, atraviesan la membrana plasmática de las células que las sintetizan.

1.7 Efectos metabólicos de los glucocorticoides

Los GC son moléculas no polares, de muy baja solubilidad en medios acuosos como la sangre, razón por la cual en la circulación se encuentran mayoritariamente unidos a proteínas transportadoras. En el caso del cortisol y de la corticosterona, aproximadamente el 90% se encuentra unido a la proteína de transporte de corticosteroides (CBG, corticosteroid-binding globulin). Dado que sólo la fracción libre es biológicamente activa, los niveles de CBG regulan el acceso del cortisol o la

corticosterona a los tejidos, afectando así su actividad biológica y también su metabolización, primero en el hígado, y luego en el riñón.

El mecanismo clásico de acción de los GC involucra su unión a receptores citoplasmáticos que se encuentran inactivos unidos a chaperonas (como la HSP90), y la translocación de este complejo al núcleo celular donde regula la transcripción de genes blanco, mecanismo conocido como "efecto genómico" de los GC. En ausencia de ligando, el GR se localiza principalmente en el citoplasma, mientras que el complejo GR-ligando es principalmente nuclear. Una vez en el núcleo, el GR regula la expresión génica mediante la unión directa a secuencias específicas de DNA o por la interacción con otros factores de transcripción. Estos dos mecanismos se conocen como *transactivación* o *transrepresión*, respectivamente. Clásicamente, se reconoce que la homodimerización del GR es necesaria para llevar a cabo el proceso de transactivación, mientras que la isoforma monomérica es responsable del mecanismo de transrepresión, aunque este modelo ha sido puesto en debate recientemente [19]. En estudios posteriores, se describieron también "efectos no genómicos" de los GC que involucran su interacción con receptores de membrana y que generan respuestas inmediatas, similares a las descriptas para hormonas peptídicas [20].

Los GC son mensajeros químicos de la señal de estrés que, a nivel metabólico, inducen los mecanismos responsables del aumento de la disponibilidad de nutrientes que constituyen el sustrato celular necesario para las respuestas de tipo "lucha o huida" (*fight or flight).* La activación del GR promueve la estimulación de vías metabólicas como la gluconeogénesis y la secreción de lipoproteínas a nivel

hepático y también favorece la diferenciación de adipocitos y la lipólisis en el tejido adiposo (revisado por Wang M [21]). Un aumento sostenido en los niveles séricos de GC, como los que se encuentran en pacientes con síndrome de Cushing, promueve una distribución de grasa corporal particular, en la que los depósitos lipídicos viscerales se ven incrementados. En este sentido, un aumento en los niveles de corticosterona en el tejido adiposo (por la sobreexpresión de la enzima 11 β-HSD 1 en este tejido) resulta en la expansión preferencial de depósitos de grasa mesentéricos (viscerales) y en la hipertrofia de los adipocitos [22]. A nivel del músculo esquelético los GC promueven la degradación de proteínas, lo que aumenta la disponibilidad de sustratos para la gluconeogénesis hepática. Los GC también, disminuyen la captación de glucosa y reducen los depósitos de glucógeno hepáticos. A nivel pancreático, estas hormonas esteroideas inhiben la secreción de insulina, mientras que aumentan la de glucagón, y generan hiperplasia de las células β.

La figura 6 resume algunos de los efectos metabólicos de los GC.

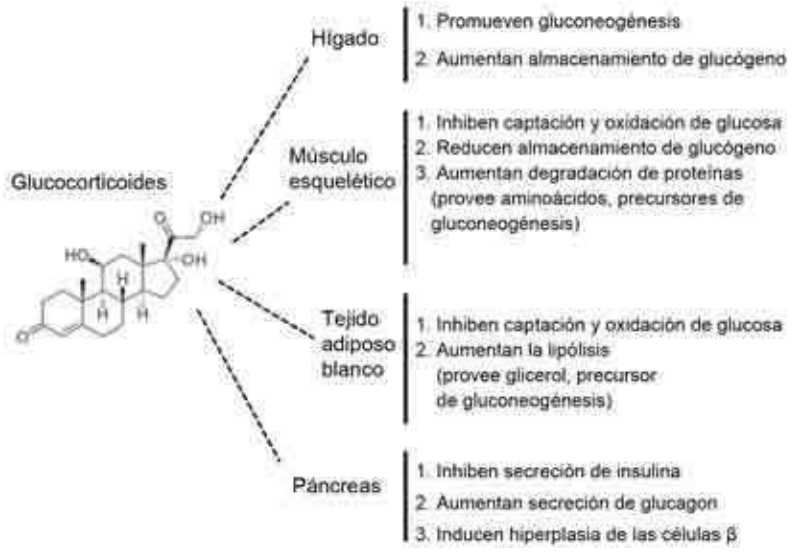


Figura 6: ***Efectos metabólicos de los GC en diferentes tejidos.*** Wang et al [23].

1.8 Otros efectos de los glucocorticoides

Los GC son potentes anti-inflamatorios con efectos a múltiples niveles y en prácticamente todos los tipos celulares involucrados en la respuesta inflamatoria. El tratamiento con GC inhibe la activación de las vías pro-inflamatorias mediadas por MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) en macrófagos activados por LPS; interfiere con la maduración de las células dendríticas (que al permanecer en su estado inmaduro tienen una mayor capacidad de captura y procesamiento de antígenos); y determina el patrón de expresión de citoquinas, y por consiguiente, el patrón de diferenciación de los diferentes subtipos linfocitarios [23]. También se ha demostrado que la activación del GR inhibe la síntesis de citoquinas, como TNFα, IL-6 e IL-8 [24-26], efecto que involucra la heterodimerización entre el GR y factores de transcripción como NFκB y AP-1 (*transrepresión*), involucrados en la transcripción de genes relacionados con procesos inflamatorios.

Los estudios realizados por Besedovsky y colaboradores en la década de 1980 fueron pioneros en estudiar aspectos fundamentales de la comunicación entre el sistema inmune y el endócrino. En estos trabajos se describe por primera vez la activación del eje HHA por la IL-1β [27]. Desde entonces se ha demostrado que citoquinas como las interleuquinas y el factor de necrosis tumoral (TNF-α) pueden acceder al cerebro mediante los capilares fenestrados en los órganos circumventriculares cerebrales, y activar la liberación de CRH, y el eje HHA con el consecuente aumento en los niveles circulantes de GC, lo que en última instancia suprime la respuesta inmune [28]. Por otro lado, también se han atribuido efectos

permisivos a los esteroides adrenales, en el sentido de que favorecen la respuesta a otras hormonas, como por ejemplo la hormona tiroidea [3].

A continuación, la tabla 1 resume efectos genómicos de la activación del GR.

Nombre	Vía en la que participa	Regulación
Glutamina sintetasa	Metabolismo de aminoácidos	positiva
Triptófano oxigenasa	Catabolismo de aminoácidos	positiva
PEPCK (hígado)	Gluconeogénesis	positiva
Glucosa 6 fosfatasa	Gluconeogénesis	positiva
Leptina	Metabolismo energético	positiva
GLUT 4	transporte de glucosa	positiva
Lipasa sensible a hormonas	metabolismo lipídico	positiva
Lipoproteínlipasa (LPL)	metabolismo lipídico	positiva
TNFα	citoquina pro inflamatoria	negativo
IL-6	citoquina pro inflamatoria	negativo
IL-8	citoquina pro inflamatoria	negativo
CRH	eje HHA – respuesta a estrés	negativo
ACTH	eje HHA – respuesta a estrés	negativo

***Tabla 1*: Regulación de la expresión génica por GC.** En la tabla se muestran ejemplos de proteínas codificadas por genes con secuencias GRE en su región promotora, blanco de regulación por GC, se indican las vías asociadas, y el efecto positivo o negativo de los GC sobre la expresión de cada gen. Adaptado de Wang M. [21]

2 . El síndrome de resistencia a insulina

2.1 Insulina

La insulina es una hormona clave en la regulación de la homeostasis energética. Su identificación como factor hipoglucemiante y su purificación con fines terapéuticos, les valieron a los investigadores Banting y Macleod el premio Nobel en Fisiología y Medicina en el año 1923.

Esta hormona peptídica de 5,8 kDa es sintetizada y liberada por el páncreas endócrino, particularmente por las células β ubicadas en agrupaciones de células conocidas como *islotes de Langerhans* que comprenden también a las células α, δ y PP. Las células α sintetizan y secretan glucagón, una de las principales hormonas hiperglucemiantes, que participa junto con la insulina en la regulación de la homeostasis energética. Las células δ presentan inmunoreactividad para somatostatina, también como conocida como hormona inhibitoria del factor de crecimiento. Las células PP sintetizan y secretan el polipéptido pancreático, relacionado con la regulación local de la secreción endócrina y exocrina del páncreas.

Las células β sintetizan insulina como pre-proinsulina, que es posteriormente procesada a proinsulina. A su vez, la proinsulina se convierte en insulina y péptido C, se almacena en gránulos de secreción como insulina preformada, y se libera en forma post-prandial. La síntesis de la insulina se regula a nivel transcripcional y traduccional, y su secreción involucra una secuencia de eventos en las células β que llevan a la fusión de los gránulos de secreción con la membrana plasmática [29].

Este proceso se regula principalmente por los niveles sanguíneos de glucosa que, luego de su ingreso a las células mediado por el transportador GLUT2, entra a la vía glucolítica, aumentando la concentración intracelular de ATP. Esto lleva al cierre de canales de K^+ sensibles a ATP y genera una despolarización de la membrana celular, lo que induce la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, y la exocitosis de los gránulos de secreción que contienen insulina (Figura 7).

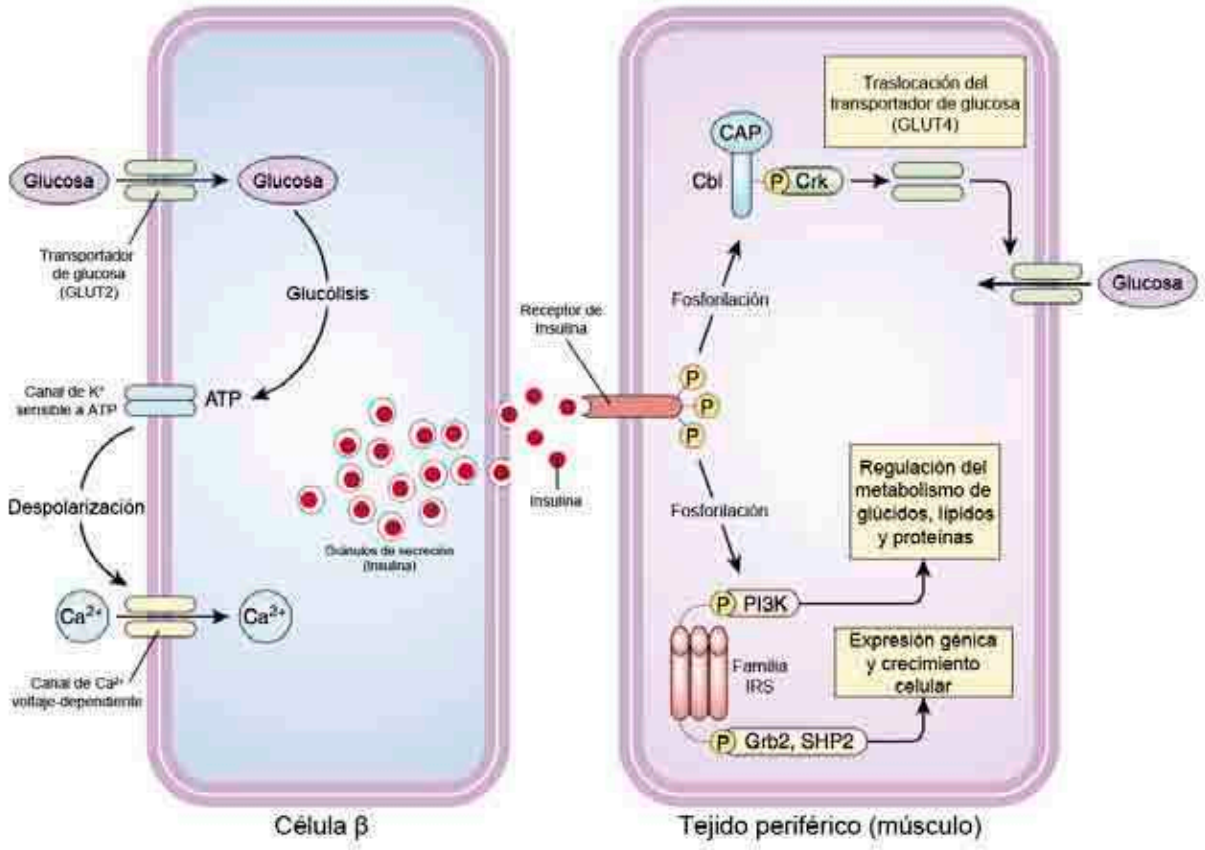


***Figura 7*: Regulación de la secreción de insulina de la célula β y efectos de la insulina sobre tejidos periféricos (crecimiento, captación de glucosa y metabolismo de músculo y tejido adiposo).** Adaptado de Notkis A.L. (2002) [30].

2.1 Vías de transducción de señales activadas por la insulina

La unión de la insulina a sus receptores de membrana induce la activación de vías anabólicas en sus células blanco. El receptor de insulina (RI) es un heterotetrámero, compuesto por dos subunidades extracelulares (α) y dos subunidades transmembrana (β) unidas entre sí por puentes disulfuro. Ambas subunidades están codificadas por un único gen, cuyo producto de traducción es un pro-receptor, que es clivado post-traduccionalmente generando las subunidades α y β [31]. El RI pertenece a la familia de los receptores de tipo tirosina quinasa. La unión de insulina al RI genera un cambio conformacional, que reduce la distancia entre los dominios tirosina quinasa de las subunidades β, y permite la fosforilación cruzada del receptor. La fosforilación de estos sitios correlaciona positivamente con la capacidad del RI de fosforilar a sus sustratos. Según resultados de estudios cristalográficos, la autofosforilación del receptor induce cambios conformacionales que facilitan la unión del ATP, y el reclutamiento de sustratos fosforilables, entre los que se encuentra la familia de sustratos del receptor de insulina (IRS) [31]. Al ser fosforilados, los IRS se transforman en el punto de nucleación de un complejo de proteínas que transmiten el mensaje desde el receptor de membrana al citosol y al núcleo a través de diversas proteínas intermediarias. Se ha descripto que la unión de insulina a su receptor activa dos grandes vías de señalización, asociadas a sus efectos metabólicos y mitogénicos, la de PI3K y la de Ras, respectivamente.

La activación de PI3K induce la fosforilación del fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato (PIP2) que se transforma en fosfatidil-inositol-3, 4, 5-trisfosfato (PIP3). Este fosfolípido de membrana recluta y/o activa proteínas que contienen dominios PH

(dominios con homología a pleckstrina), entre los que se encuentran enzimas, sustratos, adaptadores moleculares y elementos del citoesqueleto. Entre otros, PIP3 recluta a la membrana a la quinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1) y a su sustrato, la quinasa Akt (PKB). Una vez en la membrana, Akt es fosforilada tanto por PDK-1, en su residuo treonina 308, como por el complejo mTORC2 (complejo 2 del *mammalian Target Of Rapamycin*), en su residuo serina 473. La activación de la vía de la quinasa Akt regula la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo, como la glucógeno sintasa quinasa 3 y la fosfofructoquinasa 2, y también la translocación del transportador GLUT4 hacia la membrana plasmática, favoreciendo la activación de vías anabólicas celulares (como la síntesis hepática de glucógeno, triglicéridos y proteínas), y la captación de glucosa en los tejidos insulinosensibles [31]. A su vez, Akt es capaz de activar la vía de mTORC1 que regula el crecimiento y el metabolismo celular. Por otro lado, la activación de Akt promueve la degradación proteosómica de factores de transcripción de la familia FoxO, involucrados en la inducción de la apoptosis y la inhibición del crecimiento celular [31].

Otra vía de transducción de señales activada por la insulina es la que involucra a la proteína adaptadora Grb2, que se une a los IRS fosforilados a través de su dominio SH2, y activa la vía de Ras, promoviendo la activación de la cascada de Raf/MEK/ ERK, proteínas de la familia de las MAPK involucradas en el control del programa transcripcional que regula el crecimiento celular y la mitogénesis [30, 31]. La activación de las vías de las MAPK p38 y JNK (c-*Jun N-terminal kinase*) por la acción de insulina, en cambio, ha sido relacionada con el cierre de la respuesta. En

particular, la activación de JNK participaría en la fosforilación de los IRS en residuos Ser [31].

2.2 Resistencia a la insulina

2.2.1 Definiciones, características y prevalencia

La resistencia a la insulina (IR) se caracteriza por una respuesta biológica disminuida a la insulina, que afecta las diferentes vías de señalización activadas por esta hormona. Entre otros efectos, el establecimiento de IR resulta en un aumento de la lipólisis del tejido adiposo, 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). Como consecuencia de esto se detectan cambios en parámetros bioquímicos plasmáticos, característicos del estado de IR, y que contribuyen a su detección: aumento de los niveles de ácidos grasos no esterificados circulantes (AGNE) , hipertrigliceridemia y tendencia a la hiperglucemia.

La IR es un trastorno común a diversas enfermedades metabólicas, incluyendo la obesidad, la tolerancia alterada a la glucosa, la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), la dislipidemia, la hipertensión y la enfermedad cardiovascular [32]. Dada su elevada prevalencia y marcada repercusión sobre la morbimortalidad de la población general, esta patología representa un objetivo de alto interés en la investigación biomédica.

Aproximadamente, un tercio de la población adulta occidental presenta las características del síndrome metabólico, también llamado metabólico-vascular o de

IR. La caracterización clínica de este síndrome permite la detección de pacientes con alto riesgo de tener diabetes incidental a mediano plazo [33].

Según la definición más reciente de la Federación Internacional de Diabetes (IDF), se diagnostica síndrome metabólico cuando un paciente presenta obesidad central (definida por la circunferencia de cintura), sumada a dos o más de los siguientes factores [34]:

- hipertrigliceridemia
- bajos niveles de HDL-colesterol
- hipertensión arterial
- hiperglucemia en ayunas

Los datos epidemiológicos de la IDF correspondientes al año 2011 indican que el 9.2% de la población latinoamericana de adultos entre 20 y 79 años padecen DMT2, uno de los trastornos más frecuentes asociados con la progresión de la IR [33]. Más grave aún es que se estima que aproximadamente el 45% de los pacientes con diabetes ignora su condición. Los cambios en el estilo de vida, marcados por un mayor sedentarismo (que se traduce en una disminución en el gasto calórico) sumado al consumo de dietas hipercalóricas, ricas en grasas saturadas y azúcares simples, se asocia en un aumento en los índices de obesidad poblacional [35], incremento que ha alcanzado proporciones alarmantes en las últimas décadas.

2.2.2 Etiopatogenia de la IR

Hasta el momento no existe consenso con respecto a la etiopatogenia de la IR. Si bien la influencia genética es un factor importante, la dieta también juega un rol preponderante en su génesis [36]. También se ha sugerido la participación de otros factores, como la malnutrición materno infantil y los cambios en el estilo de vida

incluyendo los procesos de urbanización, el envejecimiento de la población y el sedentarismo [37].

Con respecto a los mecanismos involucrados en la generación de IR y de DMT2 se ha propuesto que un aumento sostenido en los niveles circulantes de glucosa y de ácidos grasos puede tener efectos deletéreos (glucotoxicidad y lipotoxicidad respectivamente) tanto a nivel tisular como celular [38]. Por otro lado, si bien existe una clara asociación entre el aumento en los niveles 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 si es producto de su deposición en tejidos insulinosensibles [39, 40].

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 masa de grasa corporal, y en particular, del tejido adiposo visceral [41, 42]. El tejido adiposo está compuesto por adipocitos y la fracción vascular estromal, que incluye a los macrófagos residentes. Los adipocitos producen leptina, adiponectina, visfatina, IL-6, MCP-1, entre otros factores. En la obesidad, la leptina y posiblemente otros factores producidos por los adipocitos, los macrófagos o ambos tipos celulares estimulan la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, lo que promueve la migración de monocitos que pueden diferenciarse a macrófagos en el tejido adiposo. Los macrófagos presentes en el tejido adiposo de individuos obesos producen mayores niveles de TNF-α, IL-6, y quimioquinas que aquéllos de individuos normopesos [42], lo que contribuye con el estado inflamatorio sistémico.

Entre los marcadores de esta 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 lo tanto 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 DMT2 [43].

2.2.3 Procesos asociados a la IR: estrés oxidativo (EOx)

La asociación entre la generación de EOx en los tejidos, como consecuencia del desbalance entre la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) y los sistemas antioxidantes tisulares, y la IR ha sido un tema de intensa investigación en los últimos años. En este sentido, diversos estudios han mostrado que tratamientos antioxidantes mejoran la sensibilidad a la insulina, tanto en modelos animales como en humanos [44-51].

El metabolismo aeróbico implica la oxidación de moléculas a expensas de la reducción de oxígeno como aceptor final de la cadena de transporte de electrones. En células eucariotas, la generación de EROs es una consecuencia habitual del metabolismo que, en condiciones fisiológicas, es contrarrestada por los sistemas de defensa antioxidante celulares, lo que previene el daño oxidativo [52].

La dieta occidental aporta niveles excesivos de combustibles, cuya metabolización ha sido implicada en un aumento en la generación de EROs. Por ejemplo, un aumento de la concentración intracelular de glucosa induce su metabolización por la vía glucolítica y el ciclo de Krebs y un incremento de la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, lo que puede generar especies derivadas del oxígeno parcialmente reducidas, como el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$). Un excesivo aporte

tisular de ácidos grasos también genera un aumento de la concentración intracelular de acetil-CoA, producto de la β-oxidación, que contribuye a incrementar la actividad del ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones y, por consiguiente, a la sobreproducción de EROs en la mitocondria [52]. Por otra parte los ácidos grasos pueden ser utilizados para la síntesis de diacilglicerol (DAG) y contribuir así a la activación de la proteína quinasa C (PKC), lo que lleva a un aumento en la expresión de la NADPH oxidasa y a la generación de EOx en tejidos expuestos a una sobrecarga de nutrientes [53]. Estudios recientes en personas sanas demostraron la inducción aguda de IR a nivel muscular durante una infusión de lípidos, que se asoció con el aumento en los niveles intramusculares de DAG, la activación de PKCθ y el incremento en los niveles de fosforilación de IRS en residuos Ser. También se encontraron aumentados los niveles de DAG, PKCθ e IR muscular en pacientes con IR y diabetes tipo 2 [54].

Un desbalance redox celular también puede activar las vías de señalización de quinasas sensibles a stress como SAPK (*stress-activated protein kinases,* familia a la que pertenece la quinasa JNK) e IKKβ, entre otras [55]. Se ha demostrado que tanto el receptor de insulina como las proteínas IRS (IRS-1, IRS-2) pueden ser sustratos de quinasas como JNK. La fosforilación del receptor de insulina en residuos serina y treonina, disminuye su capacidad de respuesta. Por otro lado, los niveles de las IRS son regulados por fosforilación, ya que la misma los hace más susceptibles a la degradación por proteosoma [56]. También, la fosforilación en serina de los IRS evita la formación de un sitio de anclaje para la PI3K, interrumpiendo la transducción de la señal desde el receptor [57].

Frente a la generación de EOx las células inducen la actividad de diversos sistemas antioxidantes que participan de la restauración del balance redox y que pueden ser clasificados como enzimáticos y no enzimáticos. Entre los primeros se puede incluir a las enzimas encargadas de la eliminación del anión superóxido, formado por la reducción parcial del oxígeno. En primer lugar, la enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la conversión de $^{\bullet}O_2^-$ a H_2O_2, que es sustrato de las enzimas catalasa (lisosomal) o glutatión peroxidasa (GPx, enzima mitocondrial). En esta última reacción se consume glutatión reducido que es regenerado por la actividad de glutatión reductasa a expensas de NADPH (Figura 8). La enzima catalasa se expresa en la mayoría de los tejidos, y su expresión es particularmente alta en hígado y eritrocitos [58]. Otros sistemas antioxidantes de relevancia son las tiorredoxinas, implicadas en la reducción de residuos Cys de proteínas, intercambiando grupos tioles. A nivel hipofisario, se ha demostrado la expresión de esta proteína en cultivos primarios de hipófisis de rata, y su participación en la inducción de la secreción de hormona de crecimiento (GH) inducida por GRF (factor liberador de hormona de crecimiento) [59] .

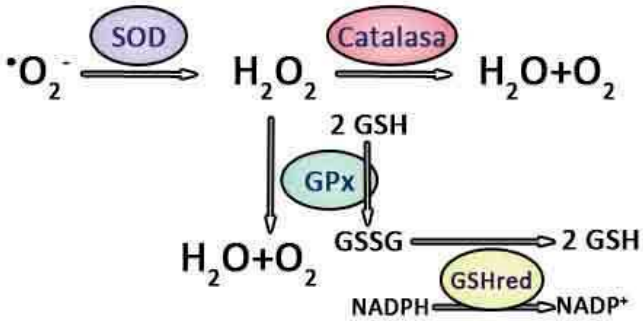


Figura 8: ***Sistemas enzimáticos de defensa contra el estrés oxidativo intracelular***. El catabolismo del anión superóxido ($^{\bullet}O_2^-$) involucra su dismutación a H_2O_2 por la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial o citoplasmática. A su vez, el H_2O_2 se

puede convertir en H_2O por la acción de las enzimas catalasa o glutatión peroxidasa (GPx) con la oxidación concomitante de glutatión (GSH). La enzima glutatión reductasa (GSHred) regenera el glutatión consumido. Modificado de Johansen et al (2005) [60].

La hemo oxigenasa (HO) es una enzima 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 considera a la inducción de la actividad de HO como un mecanismo de defensa antioxidante celular ya que su acción disminuye los niveles del grupo hemo (compuesto oxidante) y, en conjunto con la actividad de la biliverdina reductasa, genera bilirrubina, un compuesto con capacidad antioxidante. Se han descripto tres isoformas de esta enzima: la HO-1, que es inducible, y las HO-2 y HO-3 que en general presentan expresión constitutiva. La HO-1, también conocida como Hsp32 (*32 kDa heat shock protein*), se expresa 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 actividad 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 (hemo) y varias hemoglobinas [61, 62].

Entre los antioxidantes no enzimáticos endógenos se incluyen las vitaminas A (retinol, retinal, ácido retinoico y carotenoides), vitamina C (ácido ascórbico) y E (tocoferoles y tocotrienoles), el glutatión (GSH), el ácido alfa-lipoico (ALA o tióctico),

la coenzima Q10, cofactores enzimáticos como el ácido fólico, el ácido úrico, y las vitaminas B1 (tiamina), B2 (rivoflavina), B6 (piridoxina) y B12 (cobalamina) [60]. La melatonina, descripta inicialmente como una hormona producida en la glándula pineal, es también considerada un potente antioxidante. La figura 9 muestra las estructuras del ALA y de la melatonina.

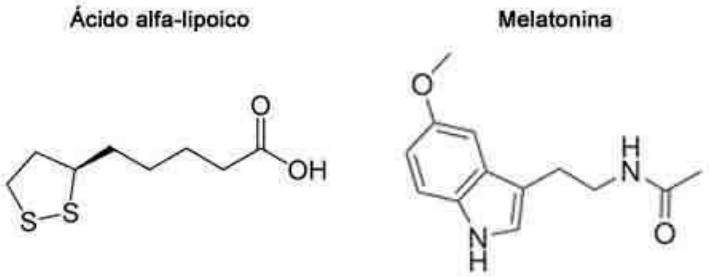


Figura 9: ***Estructura molecular de los dos compuestos antioxidantes utilizados en este trabajo***: Ácido α-lipoico (izquierda), y melatonina (derecha).

El ALA es un antioxidante endógeno que se sintetiza en la mitocondria a través de la actividad de la enzima ácido lipoico sintetasa [63]. Como en mamíferos su síntesis endógena es relativamente baja, el ALA es incorporado fundamentalmente por la ingesta de determinados alimentos de origen vegetal (como la espinaca, el brócoli y el tomate) o animal (como el hígado o el riñón), y puede actuar tanto en medio acuoso como lipídico [63].

El ALA y su forma reducida, el ácido dihidrolipoico (DHLA), son moléculas anfipáticas que presentan una gran capacidad de secuestrar radicales libres y formar complejos con cationes metálicos. La reducción de los niveles de EROs se da predominantemente a través de su forma reducida DHLA, aunque el ALA también es capaz de inactivar radicales libres [63]. Además, este par redox participa de la

regeneración de otros antioxidantes celulares no enzimáticos, como se esquematiza en la Figura 10.

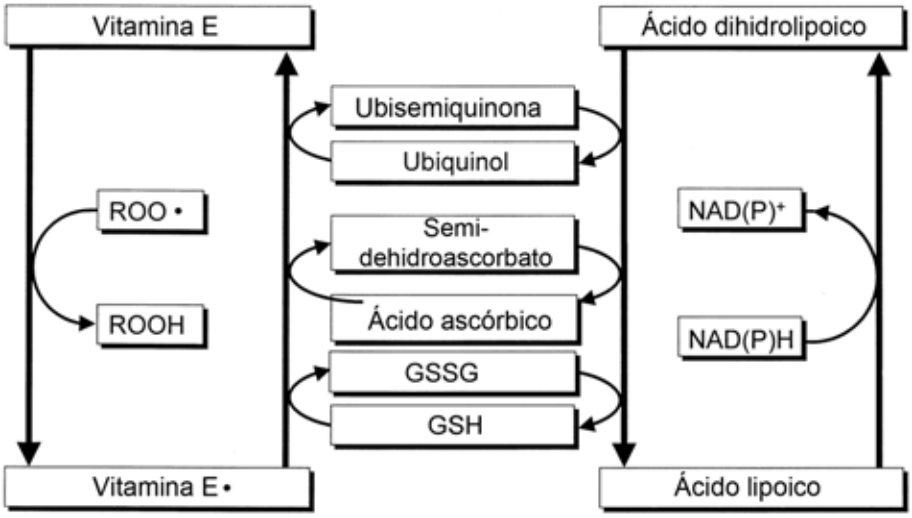


Figura 10: ***Ciclo de regeneración del pool de antioxidantes intracelulares.*** Interacción entre los ciclos de regeneración de la vitamina E, el ubiquinol, el ácido ascórbico (vitamina C), glutatión y ácido lipoico. Adaptado de *Packer et al*, 2001 [63].

Además de sus propiedades antioxidantes, también se han descripto otras funciones biológicas del ALA como antiinflamatorio y como activador de la quinasa dependiente de AMP (AMPK) [64-66]. En particular, el tratamiento con ALA en un modelo animal de IR por la administración de una dieta rica en fructosa, previno el desarrollo de IR [67], y su administración oral o intravenosa a pacientes con DMT2 mejoró significativamente el metabolismo de la glucosa [48]. También se observó una disminución en los niveles de marcadores pro-inflamatorios (IL-6 y el activador tisular del plasminógeno) en pacientes con síndrome metabólico tratados con ALA [68].

La melatonina (N-acetil-metoxitriptamina) es una indolamina cuyos grupos funcionales no sólo son determinantes de su especificidad de unión al receptor, sino

también de su carácter anfipático, lo que le permite acceder a todos los compartimientos celulares [69]. Además de sus reconocidas funciones fisiológicas (regulación del ciclo sueño/vigilia), la melatonina también tiene efectos neuroprotectores y antioxidantes. En este sentido, se ha descrito que la melatonina puede actuar como *scavenger* de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (como el óxido nítrico, NO, y el peroxinitrito, $ONOO^-$), así como también de radicales orgánicos (como por ejemplo, intermediarios de la generación o el metabolismo de lipoperóxidos). La melatonina también promueve la expresión de genes de respuesta antioxidante, y la inhibición de la expresión de genes pro-oxidantes [69]. Es de notar que, al igual que el ALA, la melatonina puede actuar regenerando otros antioxidantes. En este sentido, se ha demostrado que el tratamiento de ratones con melatonina puede prevenir la disminución de los niveles hepáticos de ácido ascórbico y de α-tocoferol, bajo condiciones de EOx experimental inducido por una dieta con alta concentración de colesterol [70].

2.2.4 Procesos asociados a la IR: inflamación

Como se mencionó anteriormente, diversas evidencias clínicas, epidemiológicas y experimentales han llevado a postular una asociación entre la inflamación crónica sistémica y la generación de IR relacionada con la obesidad [71-74].

Se ha descripto que pacientes con obesidad e IR presentan niveles plasmáticos elevados de citoquinas pro-inflamatorias como TNF-α, IL-6 y proteína C reactiva (PCR), que pueden funcionar como marcadores del desarrollo de DMT2. En pacientes obesos se observa también inflamación del tejido adiposo, con infiltración de macrófagos que podrían contribuir a la producción de adipocitoquinas [55]. En

este sentido, la sobreexpresión de la proteína MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) en adipocitos aumenta la infiltración de macrófagos y disminuye la sensibilidad a insulina, mientras que por el contrario la deleción de su receptor (CCR2, *C-C motif chemokine receptor-2*) previene el desarrollo de IR y de inflamación en ratones alimentados con dietas ricas en grasa (HFD) [75, 76].

La captación, esterificación y almacenamiento de lípidos en el adipocito, en condiciones normales luego de una ingesta, son considerados mecanismos beneficiosos que previenen la deposición de lípidos y la lipotoxicidad en otros tejidos. Sin embargo, frente a una sobrecarga nutricional, la lipogénesis y el depósito de TAG en gotas lipídicas en el citoplasma de los adipocitos promueve la expansión del tejido adiposo (hipertrofia). Diversos estudios describen aumentos en la tasa de lipólisis y en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF-α en el tejido adiposo hipertrófico de pacientes obesos [42, 77]. Los ácidos grasos liberados pueden estimular procesos inflamatorios activando receptores de tipo Toll (TLR-2, TLR-4). En ese sentido, se ha establecido una correlación entre el incremento de la lipólisis y el reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo [78], sugiriéndose que ambos procesos característicos de la obesidad (la inflamación del tejido adiposo y el aumento del eflujo de ácidos grasos) podrían contribuir a la génesis de las complicaciones asociadas a la misma.

2.2.5 Procesos asociados a la IR: estrés de retículo endoplasmático y autofagia

El retículo endoplasmático (RE) es un complejo sistema de membranas celulares dispuestas en forma de sacos aplanados y túbulos interconectados. En él se realiza el plegamiento y la distribución de proteínas recientemente sintetizadas. Si la tasa

de síntesis de proteínas sobrepasa la capacidad del RE de plegarlas correctamente, estas proteínas comienzan a acumularse en su interior, desencadenando la "respuesta a proteínas mal plegadas" (UPR, *unfolded protein response*). Esta respuesta involucra la activación de 3 vías de señalización, a través de proteínas asociadas a la membrana del RE: ATF6 (*activating transcription factor-6*), PERK (*PRK-like eukariotic initiation factor 2α kinase*), e IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*). En condiciones basales, estas proteínas trasmembrana se encuentran inactivas gracias a su unión intraluminal a la chaperona BiP/GRP78 (*binding immunoglobulin protein/ 78kDa glucose-regulated protein*). Frente a la acumulación de proteínas mal plegadas, GRP78 es reclutada hacia el interior del lumen del RE, liberando a las proteínas iniciadoras de la UPR, y activando las cascadas de señalización asociadas (Figura 11). La activación de ATF6 involucra su translocación al complejo de Golgi, donde es procesada proteolíticamente y convertida en un factor de transcripción. Entre los genes blanco de ATF6 se encuentran los que codifican para proteínas chaperonas, encargadas del correcto plegamiento de las proteínas. La activación de la vía de PERK genera la inhibición global de la transcripción mediante la fosforilación e inactivación del factor iniciador de la traducción eIF2α. La activación de IRE1 inicia mecanismos que llevan al procesamiento post transcripcional del ARNm de XBP-1. A partir del producto de *splicing* se sintetiza el factor de transcripción XBP-1s, que activa genes involucrados con la degradación proteica mediada por el RE (ERAD, *endoplasmic reticulum-associated degradation*). Estas tres vías colaboran entre sí en la resolución del estrés de RE generado por la acumulación de proteínas mal plegadas [79].

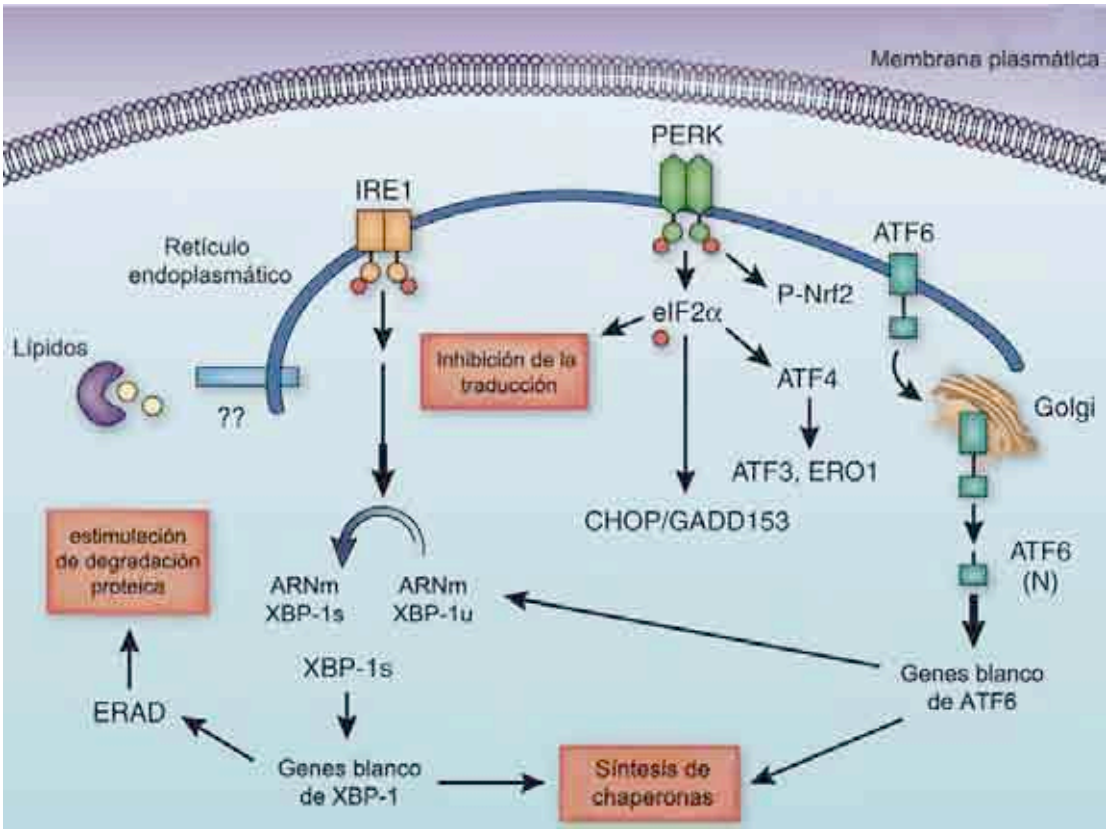


Figura 11: ***Vías canónicas involucradas en la respuesta a proteínas mal plegadas (URP).*** Adaptado de Hotamisligil G. (2010) [79].

Se ha descripto que la activación de la UPR afecta el metabolismo de glúcidos, aminoácidos y lípidos. Por ejemplo, ratones deficientes en la proteína XBP-1 hepática alimentados con una dieta rica en carbohidratos mostraron niveles de TAG séricos disminuidos y no desarrollaron hígado graso, sugiriéndose un rol de la vía de IRE1 en la lipogénesis y la acumulación ectópica de lípidos inducida por dietas obesogénicas [80]. Por otro lado, estudios realizados en pacientes han llevado a postular que la hiperinsulinemia, frecuentemente asociada con la obesidad, genera estrés de RE en el tejido adiposo, posiblemente mediante la inducción de la síntesis

proteica, que lleva a la acumulación de proteínas mal plegadas y ubiquitinadas en el RE [81].

La autofagia es un proceso celular complejo, altamente conservado a lo largo de la evolución que puede ser activado por situaciones de estrés metabólico (como por ejemplo, bajos niveles de nutrientes celulares), así como también por la acumulación de organelas o proteínas defectuosas y por la infección por patógenos intracelulares [82]. Se trata de un proceso dinámico que involucra el transporte de elementos a reciclar (también denominados, *cargo*) envueltos en vesículas de doble membrana denominadas *autofagosomas*, que al fusionarse con los lisosomas son degradados por acción de las enzimas lisosomales (el producto de la fusión entre un autofagosoma y un lisosoma se denomina *autolisosoma*). En consecuencia se generan moléculas más simples a partir de los *cargo* degradados (por ejemplo, aminoácidos, ácidos grasos libres, colesterol, etc.) que son consecuentemente reutilizados en procesos anabólicos celulares. La proteína LC-3 ha sido ampliamente utilizada como marcador molecular del proceso de formación del autofagosoma. En condiciones basales, esta proteína se expresa como su isoforma LC-3 I, con distribución ubicua en la célula. Al activarse el proceso autofágico, esta proteína es procesada post-traduccionalmente (dando como resultado su isoforma LC-3 II, de menor peso molecular), y se trasloca al autofagosoma en formación (Figura 12). Por otro lado, la degradación de la proteína p62 (también conocida como SQSTM1, *sequestosome 1*) también es considerada como un marcador del flujo autofágico, ya que funciona como *carrier* de los *cargo* a reciclar, y es incorporada al autofagosoma y degradada en el autolisosoma [83] (Figura 12).

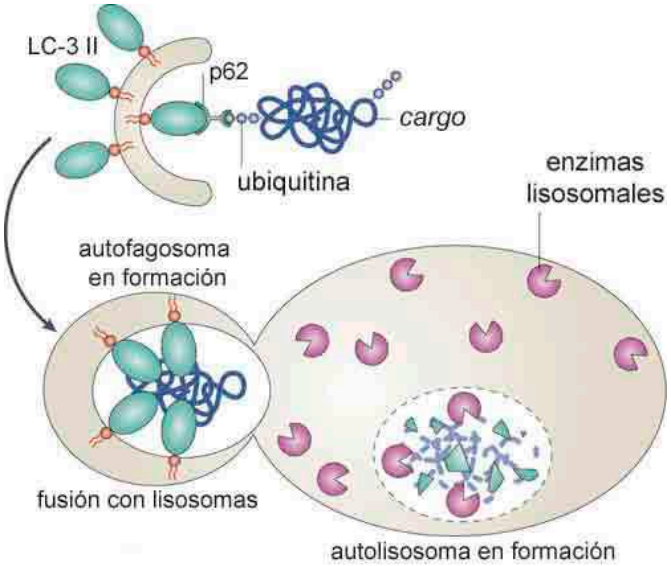


***Figura 12*: Esquema de la formación del autofagosoma y autolisosoma.** La proteína LC-3 es procesada post-traduccionalmente y trasloca a la membrana autofagosoma. La proteína p62 funciona como *carrier* de los *cargo* a degradar, y es degradada en el autolisosoma junto con ellos. Adaptado de Tyedmers *et al.* (2010) [84].

Múltiples estudios han sugerido que existe una interrelación entre la generación de estrés de RE y la inducción del proceso autofágico [85-87]. La autofagia es generalmente reconocida como un mecanismo citoprotector, ya que dependiendo del contexto, podría contrarrestar el estrés de RE, aumentando la supervivencia celular. En este sentido, se ha demostrado que la inducción farmacológica de autofagia en modelos de IR inducida por dieta reduce el estrés de RE y la apoptosis de células β-pancreáticas [88]. También, se ha reportado recientemente la inducción de este proceso en el músculo gastrocnemio (gemelos) de ratones C57BL/6J macho que consumieron dietas ricas en glúcidos (15% de fructosa o glucosa en el agua de bebida) durante 7 meses, y se lo ha propuesto como una respuesta adaptativa a la lipotoxicidad generada por el consumo de estas dietas [89]. A nivel hipofisario, se ha

descripto la inducción de una forma particular de autofagia conocida como *crinofagia* (proceso que elimina el contenido de vesículas de secreción en exceso). Se ha propuesto que este proceso forma parte de la fisiología normal de la hipófisis, participando también de la remoción del exceso de material secretorio en algunas condiciones patológicas (revisado por Weckman *et al.* recientemente [90]).

2.3 Modelos animales de IR

Los roedores constituyen modelos animales ampliamente utilizados para el estudio de patologías humanas, especialmente en el caso de hipertensión, diabetes y obesidad [91, 92]. Estos modelos animales pueden agruparse, a grandes rasgos, en modelos genéticos o modelos inducidos por dieta. La tabla 2 resume y agrupa los principales modelos utilizados para estudios relacionados con diabetes y obesidad, y aporta una breve descripción de los mismos.

Existen múltiples modelos genéticos de diabetes y obesidad en roedores. Entre los modelos monogénicos de obesidad se pueden listar aquellos donde la expresión de la hormona leptina (ratones $Lep^{ob/ob}$) o las vías de señalización asociadas (mutaciones en el receptor de leptina en ratones $Lep^{db/db}$ y ratas ZDF) se encuentran afectadas. Dado que la leptina regula procesos metabólicos asociados al estado de saciedad, estos animales presentan obesidad a causa de su hiperfagia.

Mecanismo de inducción	Modelo	Características principales	Aplicaciones
Modelos obesos (monogénicos)	Ratones Lep[ob] Ratones Lepr[db] Ratas ZDF	Hiperglucemia inducida por obesidad	Tratamientos para mejorar insulino sensibilidad Tratamientos para mejorar función células β
Modelos obesos (poligénicos)	Ratones KK Ratas OLEFT Ratones NZO Ratones Tally/Ho/Jng Ratones NoncNZO10/Lt	Hiperglucemia inducida por obesidad	Tratamientos para mejorar insulino sensibilidad Tratamientos para mejorar función células β Estudio de las complicaciones de la patología diabética
Obesidad inducida	Dieta rica en grasa (ratas o ratones) Jerbo del desierto Rata africana de la hierba	Hiperglucemia inducida por obesidad	Tratamientos para mejorar insulino sensibilidad Tratamientos para mejorar función células β Tratamientos para prevenir obesidad inducida or dieta
Modelos no obesos	Rata GK	Hiperglucemia inducida por función pancreática disminuida	Tratamientos para mejorar la función y supervivencia de células β
Modelos de disfunción de células β beta inducidos genéticamente	Ratones hIAPP	Deposiciones amiloides en islotes	Tratamientos para prevenir deposición amiloide Tratamientos para supervivencia de células β
	Ratones AKITA	Disfunción células β por estrés de RE	Tratamientos para prevenir estrés de RE Tratamientos para supervivencia de células β

Tabla 2: ***Resumen de los principales modelos animales utilizados en investigación en diabetes y obesidad***. ZDK: ratas '*Zucker Diabetic Fat*'; OLEFT: ratas '*Otsuka Long Evans Tokushima Fat*'; NZO: ratones '*New Zealand Obese*'; GK: ratas '*Goto-Kakizaki*'; hIAPP: ratones transgénicos '*human islet amyloid polypeptide*'. Adaptado de King A.J. (2012) [93].

Si bien los modelos monogénicos son útiles para evaluar mecanismos moleculares específicos, también se ha sugerido que resultan poco representativos de la patología diabética humana, ya que ésta rara vez ocurre como consecuencia de alteraciones en un único gen. Debido a esto es que se han utilizado modelos poligénicos de obesidad, aunque su limitación principal es que los individuos "*wild type"* apropiados para comparar su fenotipo son poco frecuentes. Entre los modelos poligénicos se pueden mencionar a los ratones KK, las ratas OLEFT (una cepa de ratas con diabetes espontánea en los machos, de desarrollo tardío), las ratas NZO (cepa endocriada selectivamente) y los ratones *TallyHo/Jng.* En todos los casos, los animales presentan hiperglucemia, acompañada por hiperinsulinemia y/o

hiperleptinemia con resistencia a leptina, de grado variable dependiendo de la cepa [93].

Dado que el factor ambiental es determinante en el desarrollo de obesidad e IR, el uso de modelos que reproduzcan el estilo de vida de los individuos con estas patologías resulta estratégico. 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, DMT2, enfermedades cardiovasculares y esteatosis hepática no alcohólica [94]. Precisamente los modelos animales que mejor reproducen las características del síndrome de IR se generan por la administración de dietas hipercalóricas.

La alimentación de ratas macho con una dieta rica en sacarosa (DRS) constituye un modelo de síndrome de IR de fácil preparación y manejo [95]. En modelos similares (síndrome metabólico inducido por fructosa) se observa IR, hipertensión y dislipidemia, así como la generación de inflamación y EOx [96]. 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. El metabolismo de la fructosa involucra su fosforilación catalizada por la hexoquinasa, en una reacción en la que se genera fructosa-6 fosfato (sustrato de la fosfofructoquinasa 1, punto de control metabólico) o por la fructoquinasa, generando 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 [97].

La administración de DRS a ratas induce lipogénesis en el tejido adiposo epididimario [98] 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 de la presión sistólica y desarrollo de esteatosis hepática [99]. En estudios previos de nuestro laboratorio demostramos que al cabo de 7 semanas de administración de DRS, los animales presentan mayores niveles basales de corticosterona, acompañados de una mayor deposición lipídica y cambios morfológicos y funcionales en la corteza adrenal [100].

2.4 Intervenciones terapéuticas para el tratamiento de la IR: ejercicio físico.

Con el advenimiento epidémico de la IR y sus patologías asociadas, en los últimos años se han propuesto un sinnúmero de estrategias para su prevención y tratamiento.

Los protocolos, que tienen como objetivo prevenir la progresión de la alteración en la tolerancia a la glucosa a la DMT2, se basan en preservar o mejorar la función de las células β-pancreáticas, o bien en mejorar la sensibilidad periférica a insulina. En este sentido, el sobrepeso (consecuencia del estilo de vida sedentario y el consumo de dietas hipercalóricas) es reconocido como un factor de riesgo de gran relevancia, y los tratamientos orientados a la disminución del peso corporal (farmacológicos y/o quirúrgicos, revisados recientemente por Kanat *et al.* [101]) han demostrado

mejorar estos parámetros [102-104]. Se estima que cuando un individuo pierde 5% de su peso corporal, su sensibilidad a insulina mejora un 30% [105].

Una estrategia ampliamente utilizada para el control del sobrepeso y la IR es el ejercicio físico [106]. 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 [107]. 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.

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 DMT2 [108, 109]. En ratas, el ejercicio demostró prevenir los efectos del consumo de DRS, favoreciendo la captación de glucosa por el tejido muscular [110]. En este sentido, se estableció también una correlación entre el incremento en la sensibilidad a insulina y el aumento en el número de transportadores de glucosa GLUT-4 en la membrana plasmática de las células musculares de animales que realizaron ejercicio de natación [111]. Por otro lado, la implementación de un protocolo de ejercicio ha probado ser efectiva para mejorar el perfil lipídico asociado a la IR, aumentando los niveles de colesterol HDL y disminuyendo los niveles de VLDL y triglicéridos [112, 113].

También se ha demostrado que el ejercicio físico mitiga el depósito de lípidos a nivel hepático y visceral, reduce la inflamación crónica subclínica y el EOx, y mejora la

señalización de insulina y la función mitocondrial (revisado recientemente por Pasos *et al.* [114]).

Se han publicado estudios donde se postula al ejercicio como una terapia de naturaleza anti-inflamatoria, ya que disminuye los niveles circulantes y la expresión tisular (hepática, pancreática y del tejido adiposo) de citoquinas pro-inflamatorias como TNFα e IL-6, y también la expresión del receptor TRL-4 y la activación de vías asociadas con inflamación (como NFκB y JNK) de ratas obesas [115-119].

El ejercicio también ha demostrado tener propiedades antioxidantes, restableciendo el balance redox tisular y aumentando la actividad de sistemas de defensa antioxidante en el músculo cardíaco, y a nivel renal y hepático [120, 121], efectos posiblemente relacionados con la activación del factor de transcripción Nrf-2 [122, 123].

El efecto del ejercicio sobre el estrés de RE en el contexto de la IR es un tema de vigente controversia. En algunos tejidos, como hipotálamo y corteza cerebral, el ejercicio crónico indujo marcadores de la activación de la UPR (como XBP-1, ATF-6 y Grp78) [124]. En otros, como el tejido adiposo, el ejercicio crónico previno el aumento de PERK y eIF2α inducido por una dieta obesogénica [115]. Esta aparente contradicción llevó a algunos autores a proponer que los efectos del ejercicio sobre el estrés de RE podrían ser dependientes del tejido y, en este sentido, la UPR funcionaría como un *switch* que regularía efectores de adaptación al estrés o de muerte, controlando las vías que regulan la supervivencia o muerte celular [114]. Según estos autores, la dirección de este *switch* dependería del tejido, de la

naturaleza e intensidad del estrés de RE, de la fase de la UPR y de la expresión de componentes de señalización de supervivencia o apoptosis.

Se ha propuesto que algunas patologías humanas (como la obesidad e IR) podrían estar asociadas a defectos en el flujo autofágico. En este sentido, se ha observado un descenso en los niveles de marcadores de este proceso a nivel hepático en modelos animales tanto genéticos como inducidos por dieta [125]. Según estudios recientes, la inducción del proceso autofágico por ejercicio podría estar involucrada en los efectos metabólicos beneficiosos del mismo [126].

3. Relación entre la regulación del eje HHA y la homeostasis de la glucosa

Como se describió en la sección 1.8, los GC son hormonas esteroideas que cumplen funciones en el desarrollo y crecimiento celular, y ejercen efectos sobre la regulación de la presión sanguínea, el balance hídrico y salino, la función inmune y el metabolismo energético. Estas acciones resultan esenciales para la supervivencia, sobre todo en situaciones de estrés.

Los niveles plasmáticos de sustratos oxidables (como glucosa, aminoácidos y ácidos grasos) se incrementan en respuesta a un aumento agudo en los niveles de GC. Sin embargo, a largo plazo, el exceso de GC incrementa la morbilidad y mortalidad a través de una variedad de efectos. Éstos incluyen la generación de obesidad, osteoporosis, hipertensión, hiperglucemia y una capacidad de respuesta disminuida a las infecciones, características del denominado *Síndrome de Cushing* [127].

Entre las complicaciones comunes de este síndrome, caracterizado por un exceso de GC circulantes, se encuentran las relacionadas con alteraciones en el metabolismo de glúcidos. Dado que el *Síndrome de Cushing* y el síndrome de IR comparten características fenotípicas similares, existen autores que proponen a los GC como actores fundamentales en la generación y/o el desarrollo de la IR [128]. A favor de esta hipótesis, se ha descripto que niveles patológicamente aumentados de GC pueden afectar el metabolismo de glúcidos y lípidos dado que:

- a nivel hepático, los GC estimulan la gluconeogénesis (por ejemplo, estimulando la síntesis de las enzimas involucradas [129], o incrementando la disponibilidad

de sus sustratos [130]). A su vez, pueden alterar la respuesta del tejido a otras hormonas, como insulina o glucagón [131], promoviendo la IR en este tejido.

- a nivel del músculo esquelético, los GC impiden el *uptake* de glucosa en respuesta a insulina, afectando la vía de señalización de esta hormona [132] y la síntesis de glucógeno [133].

- en el tejido adiposo, los GC han mostrado tener un efecto diferencial sobre los depósitos de grasa corporal, estimulando la deposición a nivel visceral, en detrimento de los depósitos subcutáneos y periféricos [134], además de promover la diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos maduros.

Se han documentado alteraciones en los niveles de GC en individuos con IR (tanto en humanos como en modelos animales). En primates, se ha 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 [135, 136]. En ratas genéticamente obesas (ratas *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 [137]. Por otro lado, evidencias de estudios epidemiológicos en humanos (revisados en [138]) muestran una asociación positiva entre los niveles de cortisol y las características más notables del síndrome metabólico, particularmente la IR y el perfil lipídico alterado. La hipersecreción de GC está asociada con la obesidad idiopática, especialmente de distribución central [139]. Estas evidencias, junto al hecho de que el bloqueo de

receptores esteroideos (de GC y de progestágenos) con RU-486 mejora la IR inducida en animales por una dieta rica en grasas [140], sugieren fuertemente la participación de la corteza suprarrenal en el desarrollo del síndrome de IR. Sin embargo, un estudio sistemático de la bibliografía realizado recientemente mostró resultados poco concluyentes sobre la relación entre los niveles de activación basal del eje HHA y el consumo de dietas hipercalóricas [141]. En este estudio, los autores enfatizan en la necesidad de lograr evaluaciones estandarizadas para discernir los efectos de la obesidad inducida por dieta sobre el eje HHA, ya que, como era de esperar, el uso de diferentes modelos y condiciones experimentales han arrojado resultados disímiles. Los resultados del análisis de la bibliografía mostraron que, en el 40% de los estudios considerados, los niveles plasmáticos de corticosterona en animales tratados con dietas ricas en grasa permanecieron normales, mientras que se encontraron aumentos y disminuciones en los niveles de esta hormona en el 30% y el 20% de los estudios, respectivamente [141].

A la fecha muy pocos trabajos han analizado el efecto directo del consumo de DRS y de la generación de IR sobre la funcionalidad del eje HHA. En nuestro laboratorio hemos demostrado recientemente que el consumo de DRS durante 7 semanas, modelo que reproduce los síntomas y signos clásicos del SM, también se asocia con un aumento en la corticosteronemia basal y una disminución en la respuesta adrenal al estímulo por ACTH exógena [100]. Sin embargo, a nuestro entender, no existen aún estudios que evalúen el curso temporal de los efectos del consumo de dietas obesogénicas sobre los niveles de activación del eje HHA, en particular sobre la función hipofisaria, y los mecanismos subyacentes.

Objetivos

Teniendo en cuenta lo expuesto en la introducción, y los trabajos previos de nuestro laboratorio, los objetivos del presente trabajo de tesis fueron:

I. Evaluar el curso temporal de los efectos del consumo de una dieta rica en sacarosa (DRS) sobre el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal, y en particular, de los cambios en la síntesis y secreción de hormona hipofisaria ACTH, principal reguladora de la esteroidogénesis adrenal.

II. Estudiar la participación de la inducción de EOx y la inflamación en los cambios observados a nivel hipofisario, mediante la implementación de terapias farmacológicas con antioxidantes, y evaluar su potencial utilidad como agentes terapéuticos.

III. Evaluar el efecto del ejercicio moderado, una estrategia terapéutica no-farmacológica ampliamente recomendada en pacientes con IR, sobre los cambios observados a nivel hipofisario generados por el consumo de DRS.

Materiales y métodos

Materiales

La solución de sacarosa 30% fue preparada con sacarosa apta para consumo humano (Azúcar Blanco refinado – Ledesma S.A., Argentina). El alimento balanceado extrusado para rata o ratón estándar fue adquirido a Horacio Gilardoni S.R.L. (C.A.B.A, Argentina). La adquisición de las drogas y alcoholes utilizados en este trabajo fue realizada bajo supervisión del SEDRONAR.

La insulina utilizada para las curvas de tolerancia intraperitoneal fue de origen porcino, calidad corriente, Betasint® (Laboratorios Beta S.A., Argentina).

La melatonina, N-acetil cisteína, el cocktail de inhibidores de proteasas y de fosfatasas, el ácido palmítico y la albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos fueron adquiridos de Sigma Aldrich (C.A.B.A., Argentina). El ácido α-lipoico utilizado (Biletán® Forte inyectable) fue gentilmente donado por Laboratorios Gador (C.A.B.A., Argentina).

La transcriptasa reversa del virus de la Leucemia Murina de Moloney (MMLV) fue adquirida en Life Technologies (C.A.B.A., Argentina). La GoTaq® polimerasa fue de Promega (Madison, WI, Estados Unidos). El Eva Green Fluorescent Dye fue adquirido de Genbiotech (C.A.B.A., Argentina).

El antisuero de corticosterona fue gentilmente provisto por el Dr. A. Belanger (Laval University, Quebec, Canada). La [1,2,6,7-^{3}H(N)]- corticosterona (0.25 mCi, 76.5 Ci/mmol) fue obtenida de PerkinElmer (Boston, MA, USA). Los kits colorimétricos enzimáticos para la determinación de triglicéridos, glucosa y colesterol fueron

comprados en Laboratorios Wiener (Rosario, Argentina). El kit colorimétrico para la medición de ácidos grasos libres fue de Randox Laboratories (Londres, Reino Unido).

El inhibidor de PI3K utilizado (LY294004) fue adquirido en BioMol® (Hamburgo, Alemania).

Todos los demás reactivos fueron de la máxima calidad disponible.

Animales y diseño experimental

En todos los experimentos se utilizaron ratas Wistar macho adultas (peso inicial 200-250g), mantenidas en jaulas grupales (3 animales/jaula) bajo condiciones controladas de temperatura e iluminación (temperatura 22 ± 2°C, ciclo de 12:12h luz:oscuridad).

Los animales recibieron una dieta estándar con alimento balanceado (Horacio Gilardoni S.R.L., C.A.B.A., Argenttina) *ad libitum* (grasas 8.7g/100g de extrusado, proteínas 24g/100g de extrusado, lisina disponible 4,8g/100g de proteína, calcio 873 mg/100 gr de extrusado), y agua corriente (grupos controles, C) o agua suplementada con 30% de sacarosa (p/v) (grupos DRS). En todos los experimentos realizados se calculó el consumo calórico diario promedio y se determinó el peso corporal una vez por semana.

Finalizados los experimentos se realizó eutanasia por decapitación luego de 4 horas de ayuno y entre las 9 y las 10 am con el fin de evitar posibles variaciones debido al ritmo circadiano.

Las adenohipófisis de los animales fueron homogeneizadas en 400µl de buffer de homogenización para la determinación de actividades enzimáticas y/o para el análisis por *western blot* (KH_2PO_4/K_2PO_4 15 mM- KCl 60 mM pH 7.4, adicionado con cócteles

de inhibidores de proteasas y fosfatasas; o en el mismo volúmen de reactivo TRI® (Genbiotech, C.A.B.A., Argentina) para la obtención de ARN total.

En la primera serie de experimentos, animales de los grupos C y DRS fueron sacrificados en las semanas 3, 5, 7, 9, 12 y 15, luego de iniciada la modificación dietaria. Se realizaron pruebas de sensibilidad periférica a la insulina en las semanas 3, 7 y 15 de tratamiento (ver test de tolerancia a la insulina *i.p.)*

En los experimentos diseñados para evaluar el efecto del tratamiento antioxidante sobre las alteraciones encontradas en la función adenohipofisaria de ratas tratadas con DRS durante 3 semanas, los animales fueron divididos al azar en 4 grupos experimentales: C (control), DRS, antioxidante, antioxidante con DRS.

Se realizaron dos tipos de tratamientos antioxidantes diferentes. En un grupo de animales se utilizó el ácido α-lipoico (ALA, 100mg/kg) administrado intraperitonealmente cada 48hs. Los animales de los grupos sin tratamiento antioxidante recibieron inyecciones de solución salina con la misma frecuencia, como tratamiento simulado. Finalizadas las 3 semanas de tratamiento, los animales fueron sacrificados y sus tejidos fueron debidamente obtenidos y preservados para su análisis.

En otro grupo, se anestesió a los animales utilizando ketamina y xilacina (50mg/kg y 2mg/kg respectivamente). Una vez alcanzado el plano quirúrgico se realizó una incisión dorsal con el fin de implantar *pellets* de 20mg de melatonina en el tejido subcutáneo, luego de lo cual los animales fueron suturados. Este procedimiento se realizó un día antes de comenzar la intervención dietaria y se repitió a los 10 días con el fin de reemplazar los implantes. Los comprimidos de melatonina se obtuvieron en

el laboratorio, homogeneizando el compuesto en un volumen mínimo de aceite vegetal neutro. Se prepararon los comprimidos de melatonina (20.0 ± 0.5 mg) el mismo día de la cirugía y se mantuvieron en oscuridad hasta su implantación. Los animales sin tratamiento antioxidante recibieron una operación simulada sin colocación de implante subcutáneo.

En los experimentos diseñados para evaluar el efecto de la actividad física moderada, los animales fueron divididos al azar en 4 grupos experimentales: control-sedentario (C-S), DRS-sedentario (DRS-S), control-ejercicio (C-E) y DRS-ejercicio (DRS-E). Los animales fueron trasladados a la sala de ejercicio para su adaptación al nuevo ambiente y a la actividad física durante la semana previa al cambio dietario. Con este fin se colocó a los animales sobre la cinta deslizante en movimiento durante un minuto. El régimen de entrenamiento consistió en ejercitar a los animales en la cinta a una velocidad constante de 0.8 km/h, incrementando el tiempo de ejercicio a lo largo de las semanas de tratamiento hasta llegar a un máximo de 15 minutos en la quinceava semana de tratamiento. Los animales que se negaron a realizar el ejercicio (aquellos que mostraron comportamiento de *freezing)* fueron excluídos del protocolo. No se utilizaron estímulos aversivos de ningún tipo para evitar fuentes externas de estrés que pudieran alterar los resultados. Se realizó un test de tolerancia a la insulina administrada en forma *i.p.* en la séptima y quinceava semanas de tratamiento para comprobar la insulino sensibilidad en los grupos experimentales. Al cabo de 15 semanas, los animales fueron sacrificados, y se obtuvo sangre y tejidos para su posterior análisis. El sacrificio de los animales se realizó 48hs después de la última sesión de ejercicio.

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 (Resolución CD FMED N°2603/2013).

Test de tolerancia a la insulina (TTI)

La prueba se realizó sin sedación para evitar posibles interferencias de la antestesia [142]. Se colocó los animales sobre una almohadilla calefaccionada a 25-28°C para favorecer la vasodilatación y de esta forma permitir la extracción de sangre. Las muestras fueron tomadas por punción y goteo de la vena caudal. Se tomó una muestra basal, a la que se denominó "tiempo 0" y luego se inyectó a los animales con insulina (0.8 UI/kg, i.p.) y se recolectaron muestras de sangre por goteo cada 5 minutos hasta los 30 minutos post inyección, luego de lo cual se les administró un mililitro de solución dextrosada al 25% para prevenir posibles descompensaciones por hipoglucemia. La glucemia se midió por un método colorimétrico enzimático GOD/POD con un kit comercial según las instrucciones del fabricante (Wiener Lab, Rosario, Argentina) en un espectrofotómetro de placa (BioTek, Estados Unidos). La sensibilidad a insulina se evaluó calculando la constante de desaparición de la glucosa (K) como $K=0.693 \times T_{½}^{-1}$, como se describió anteriormente [143]. El tiempo de depuración media ($T_{½}$) se obtuvo teniendo en cuenta la fase lineal del descenso de la glucemia en función del tiempo, mediante el programa GraphPad Software (California, USA).

Obtención de plasma y suero. Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales.

Luego del sacrificio, se recolectaron muestras de sangre troncal para la determinación de parámetros séricos y plasmáticos. Para la obtención de plasma, la sangre se colocó en tubos con EDTA (1mg/ml sangre) y se centrifugó inmediatamente a 8000rpm durante 8 minutos, a 4ºC. El plasma se alicuotó y congeló inmediatamente a -80°C. Para la obtención de suero, las muestras se recolectaron en tubos de Kahn, y se mantuvieron durante 15 minutos a 37°C para favorecer la coagulación. Una vez formado el coágulo, las muestras se centrifugaron a 3200rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras de suero se alicuotaron y congelaron de inmediato a -20°C.

Las determinaciones de las concentraciones de glucosa y de triglicéridos en suero se realizaron mediante métodos colorimétricos utilizando kits comerciales: Glicemia enzimática AA y TG Color GPO/PAP AA, respectivamente (Wiener Labs, Rosario, Argentina), según las instrucciones del fabricante.

La determinación de la concentración de ácidos grasos no esterificados del plasma se realizó con la gentil colaboración de la Bioq. Farm. María Fernanda Repetto mediante un kit colorimétrico comercial (Randox, Reino Unido).

La corticosteronemia se determinó por el método de radioinmunoensayo, según se describe en publicaciones previas de nuestro laboratorio [17]. Para evitar interferencias, los esteroides se extrajeron de las muestras de suero con diclorometano y luego de la evaporación del solvente se resuspendieron en PBS 1X.

Determinaciones de parámetros de estrés oxidativo y defensa antioxidante

a. Determinación de generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) en cultivos celulares

Finalizados los tratamientos se determinó la generación de EROs mediante la medición de la fluorescencia emitida por la oxidación de 2', 7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA), según se describió en trabajos previos de nuestro laboratorio [144]. Brevemente, luego de los tratamientos correspondientes, se retiraron los medios de incubación y luego del lavado con PBS 1X se incubaron las células AtT-20 con DCF-DA, en una concentración final de 10µM en PBS 1X, preparada a partir de una solución stock 1mM en DMSO. Este reactivo es clivado por esterasas intracelulares al ingresar a la célula convirtiéndose en 2', 7' diclorofluoresceína (DCF), que emite fluorescencia al oxidarse en presencia de EROs (Ex: 435nm; Em: 535nm).

b. Determinación de parámetros de estrés oxidativo y defensa antioxidante en adenohipófisis

Luego del sacrificio, se disecaron las adenohipófisis sobre hielo y se homogeneizaron los tejidos de cada animal en 400µl de buffer TBARS (KH_2PO_4/K_2PO_4 15 mM- KCl 60 mM pH 7.4) adicionado con inhibidores de proteasas. Los homogenatos se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 x g, a 4ºC, y los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para las siguientes determinaciones.

b.1 Ensayo de actividad de catalasa tisular

La actividad de catalasa se evaluó *in vitro* mediante la determinación del consumo de peróxido de hidrógeno en función del tiempo de incubación. Para ello, se tomaron alícuotas del sobrenadante de los homogenatos de hipófisis (15 µl) y se

agregaron 285 µl de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.4 (buffer de reacción). Se transfirió la mezcla a una placa de 96 pocillos de plástico apto para UV. Posteriormente se agregaron 50 µl de una solución de 2,5 volúmenes (223 mM) de H_2O_2 y se monitoreó el consumo del peróxido de hidrógeno durante 120 segundos, a 240 nm en un espectrofotómetro de placa (Biotek, Estados Unidos).

Finalmente a partir de la absortividad molar a 240 nm del H_2O_2 (39.4 $M^{-1}.cm^{-1}$) se calculó la actividad de la enzima catalasa, expresándola como µM de H_2O_2 consumidos por minuto por µg de proteína de tejido (µM H_2O_2/min/µg de proteína).

b.2 Determinación de productos de peroxidación lipídica

Los niveles de lipoperóxidos se determinaron en la fracción clarificada de los homogenatos de hipófisis por su reactividad con el ácido tiobarbitúrico (TBA).

Para ello se tomaron muestras de 50 µl del homogenato de hipófisis y se les agregó 50 µl de buffer KH_2PO_4/K_2PO_4 15 mM- KCl 60 mM pH 7.4 y 25 µl de SDS al 10%, en tubos Kahn de vidrio. Se adicionaron 425 µl de TBA 8 mg/ml (preparado en buffer AcH/AcNa pH 3.5 10%) a todos los tubos (conteniendo la muestra o los estándares. y, luego de vortexear, se calentó la mezcla a 100°C durante 1 hora (evitando su evaporación).

Finalmente, se determinó la emisión de fluorescencia (Excitación: 515nm, Emisión: 555 nm) en un fluorómetro de placa FLUOstar Omega (BMG LabTech, Ortenberg, Alemania). Se utilizó como estándar una curva de malondialdehído, preparado a partir de 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Los valores se expresaron en µM por mg de proteína.

Obtención de ARN total y determinación de niveles de ARNm

Los tejidos se homogeneizaron con el reactivo TRI (TRI Reagent, Genbiotech, Argentina) para la obtención de ARN total, según las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el contenido de ARN por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro de microgota (Take3, BioTek, Estados Unidos). Para las reacciones de retrotranscripción utilizaron 2µg de ARN total, que fueron pre-tratadas con DNAsa I libre de RNAsas (RQ RNAsa-free DNAsa I de Promega, Biodynamics, C.A.B.A., Argentina) con el fin de eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico. El protocolo de transcripción reversa consistió en la incubación del ARN total durante 50 minutos a 37°C en una mezcla que contenía 0.5 mM de cada dNTP, 25 ng/µl de random primers, 25 ng/µl de OligodT, 1x first-strand buffer (5X), 25 U de inhibidor de ribonucleasa, y 200 U de transcriptasa reversa (MMLV, Invitrogen, Argentina) en un volumen final de 20 µl.

Para las reacciones de PCR se utilizaron primers diseñados específicamente. Las secuencias correspondientes se detallan en la Tabla 3. Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo utilizando la enzima GoTaq® Polymerase de Promega (Biodynamics, C.A.B.A., Argentina) y EvaGreen® Fluorescent Dye (Genbiotech, C.A.B.A., Argentina), en un termociclador Rotor-GeneTM 6000© Corbett Life Science (Corbett Research, Sidney, Australia) utilizando 0.5 µl de ADNc. La mezcla de reacción consistió en: 1x PCR buffer (1.5 mM MgCl2), 0.2 mM de cada dNTP, 500 nM de cada primer específico, 0.625 U polimerasa GoTaq® y 1x EvaGreen®. Se utilizó el método de ΔΔCt para la cuantificación relativa mediante el programa Rotor-Gene 6000 Software,

Versión 1.7 (Corbett Research, Australia). Se utilizó la expresión de β-Actina como gen normalizador.

	Forward	***Reverse***
Pomc	5'-cctcaccacggaaagca-3'	5'-tcaagggctgttcatctcc-3'
TNFα	5'-tcctcacagagccagccccc-3'	5'-ctccaggacaccccggcctt-3'
Grp78	5'-ccgagtgacagctgaagaca-3'	5'-gcgctctttgagctttttgt-'3
p58^{IPK}	5'-attaaagcataccgaaagttagcac-3'	5'- agagggtcttctccgtcatcaaa-3'
Actina	5'-ccacacccgccaccagttc-3'	5'-gacccattcccaccatcacacc-3'

Tabla 3: ***Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones por PCR en tiempo real.*** *Pomc*: proopiomelanocortina; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa; GRP78: proteína de 78 kDa regulada por glucosa; P58^{IPK}: Inhibidor de 58 kDa de proteína quinasa

Determinación de niveles de expresión de proteínas

Las muestras de proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Para ello, se tomaron alícuotas de homogenatos clarificados de adenohipófisis en buffer de homogeneización (KH_2PO_4/K_2PO_4 15 mM- KCl 60 mM pH 7.4, adicionado con cócteles de inhibidores de proteasas y fosfatasas) correspondientes a 80 µg de proteínas, y se les agregó *sample buffer* (SB) 5X (Tris-HCL pH 6.5 250 mM, glicerol 50%, SDS 10%, β-mercaptoetanol y azul de bromofenol). Luego del SDS-PAGE, las proteínas fueron 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 50 minutos. Como control de la electrotransferencia se tiñeron las membranas de PVDF con Ponceau 0.2 % en TCA 3%, y luego se incubaron con solución de bloqueo (TBS-Tween 0,1% con 5% de leche descremada) durante una hora para bloquear los sitios inespecíficos. Las membranas

se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios (listados en la tabla 4). Luego de tres lavados con TBS- Tween 0.1% (1 lavado de 15 minutos y 2 de 5 minutos) se incubaron con anticuerpos secundarios utilizados (listados en la tabla 4) que permiten utilizar el sistema de detección quimioluminiscente (ECL assay, Amersham Life Science) dado que están conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP).

Inmunofluorescencia en tejido adenohipofisario

Luego de los respectivos tratamientos, animales de cada grupo experimental fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilacina (50 mg/kg y 2 mg/kg, respectivamente). Una vez anestesiado el animal y alcanzado el plano quirúrgico, se lo colocó en posición decúbito supino sobre una placa adecuada para la recolección de los líquidos de lavado y fijación. Se realizaron incisiones con el fin de abrir el torax y exponer el tejido cardíaco, y se colocó una cánula en el ventrículo izquierdo del animal, profundizando hasta la aorta. Una vez fijada la aguja de perfusión, se realizó un corte en la aurícula derecha para permitir el escape de los líquidos de lavado y se procedió a realizar la perfusión por gravedad, primero con solución fisiolófica (200ml aproximadamente, NaCl 0.9% p/v) como líquido de lavado, y luego con líquido de fijación (300ml aproximadamente, paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,1M, pH 7,4). A continuación se extrajeron las glándulas hipofisarias, y se realizó una post-fijación en la misma solución de fijación durante 12 horas. Luego de varios lavados, las muestras se deshidrataron (serie creciente de alcohol: 70%, 90% y 100%), se aclararon en acetato de N-butilo y se embebieron en parafina (Biopack, C.A.B.A., Argentina).

Se realizaron cortes de 4μm en un micrótomo de rotación (Leica Modelo RM2125 RTS, Leica, Alemania), que fueron colocados sobre portaobjetos con carga y luego deshidratados en estufa a 50°C durante 10 min. A continuación, se colocaron los portaobjetos en recipientes apropiados para la desparafinización y rehidratación de los cortes por incubación con una sucesión de distintos alcoholes (10 min por etapa: 2 incubaciones con xilol, 2 incubaciones con etanol absoluto, 2 incubaciones con etanol 96° y 1 incubación con etanol 70°). Posteriormente se realizó la recuperación antigénica mediante la incubación de los cortes en buffer citrato (Citrato de Sodio 10mM, Tween 20 0.05%, pH 6.3) durante 30 minutos a 100°C, luego de lo cual se los dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se realizó una incubación de 20 minutos con Tritón X-100 en PBS 1X, con el fin de favorecer la permeabilización de los tejidos. Luego de 3 lavados con PBS 1X, se realizó el bloqueo de potenciales sitios inespecíficos de unión del anticuerpo incubando con una solución de suero de caballo al 2% en PBS 1X durante 1h a temperatura ambiente. Trascurrido este tiempo, se incubaron los cortes con los anticuerpos seleccionados (anti ACTH 1:1000, Iba-1 1:500 ó F4-80 1:500, en PBS 1X) a 4°C, toda la noche, en cámara húmeda. Al día siguiente, luego de los lavados con PBS 1X (un lavado de 10 minutos y dos de 5 minutos) los cortes se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara oscura con una solución del anticuerpo secundario acoplados a un fluoróforo (ver especificaciones de los anticuerpos en la tabla 4). Una vez más, se lavaron los preparados, y se los incubó con solución de Hoescht 33342 (Molecular probes, Invitrogen, Argentina) 5μg/ml en PBS 1X durante 10 minutos, para la tinción nuclear. Los tejidos se montaron en medio de montaje para fluorescencia (Vectashield; Vector

Laboratories, Estados Unidos) y se observaron en un microscopio de fluorescencia (BX-50, Olympus, Estados Unidos) con cámara incorporada (3CCD, Sony, Estados Unidos). Las imágenes se obtuvieron con el software ImagePro Plus (Media Cybernetics, Estados Unidos) y fueron procesadas con el programa Imaje J (NIH, Bethesda, MD, Estados Unidos).

Para el recuento de células inmunopositivas para ACTH, se tomaron imágenes y se contó el número de células en un área de 500 x 500 pixeles (12 imágenes por tratamiento), utilizando el *plug-in* Cell Counter. Se estimó la equivalencia entre pixeles y micrómetros utilizando una fotografía de una cámara de Neubauer obtenida con el mismo aumento y bajo el mismo microscopio que las imágenes de fluorescencia. Todas las imágenes fueron obtenidas utilizando las mismas configuraciones de tiempo de exposición, brillo y contraste.

Antígeno	Especificaciones del producto	Proveedor
ACTH	Mouse mAb (sc-52980)	Santa Cruz Biotechnology, EEUU
Hemo oxigenasa-1	Rabbit pAb (ADI-SPA-896)	Enzo Life Sciences, EEUU
Catalasa	Goat pAb (AF3398)	R&D Systems, EEUU
F4-80	Rabbit pAb (sc-25830)	Santa Cruz Biotechnology, EEUU
Iba-1	Goat pAb (ab5076)	Abcam, EEUU
ED1 (CD68)	Mouse mAb (ab31630)	Abcam, EEUU
p62 (SQSTM1)	Rabbit pAb (sc-25575)	Santa Cruz Biotechnology, EEUU
LC-3	Rabbit mAb (12741)	Cell Signaling Technology, EEUU
NO_2-Tyr	Rabbit pAb (0409)	Sigma Aldrich, EEUU
β-Actina	Rabbit pAb (sc-1616)	Santa Cruz Biotechnology, EEUU
anti-rabbit	Goat HRP-conjugated IgG (170-6515)	BioRad Laboratories, EEUU
anti-mouse	Horse HRP-conjugated IgG (7076)	Cell Signaling Technology, EEUU
anti-Goat	Rabbit HRP-conjugated IgG (HAF017)	R&D Systems, EEUU
anti-mouse	Goat Cy™3-conjugated IgG (115-165-003)	Jackson ImmunoResearch, EEUU
anti-rabbit	Got Alexa Fluor®488-conjugated IgG (111-545-003)	Jackson ImmunoResearch, EEUU

***Tabla 4:* Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia y western blot**

Cultivos celulares

La línea celular corticotropa murina AtT-20/d16v-f2 fue adquirida en la ATCC (Manassas, VA, Estados Unidos). Los medios de cultivo celular DMEM y OptiMEM, los antibióticos y la Lipofectamina 2000® se compraron en Life Technologies (C.A.B.A., Argentina). El suero fetal bovino se adquirió a Natocor (Cordoba, Argentina). El ensayo de detección de actividad de luciferasa se realizó mediante el

kit Steady Glo Luciferase Assay System de Promega (Byodinamics, C.A.B.A., Argentina). Los plásmidos *Pomc*-pGL3 (*Pomc*-luc) y pRFP-LC3 fueron adquiridos en Addgene (Cambridge, MA, Estados Unidos). El plásmido de expresión pCMV-βGal fue gentilmente cedido por la Dra Adalí Pecci (Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina).

a. Ensayos utilizando plásmidos reporteros de la actividad del promotor de Pomc

Se sembraron aproximadamente 5 x 10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos y se incubaron durante 24h a 37ºC. Para las transfecciones se preparó por un lado una solución de 0.2 µg de ADN plasmídico (0.18 µg *pPomc*-luc + 0.02 µg pCMV-βGal) diluídos en 6.25 µl de medio OptiMEM® por pocillo, y por el otro una solución de 0.5 µl de Lipofectamina 2000® en 6.25 µl de medio OptiMEM por pocillo. Luego de 5 min de incubación se mezclaron ambas soluciones y se realizó una segunda incubación durante 20 min con agitación, a temperatura ambiente. El complejo ADN-lipofectamina se llevó a un volumen final de 50 µl por pocillo y se agregó entonces a las células que se mantuvieron a 37°C en atmósfera humedecida de 95% aire–5% CO_2. Luego de 3 h, se reemplazó el medio con DMEM suplementado con 10% SFB y las células se incubaron durante 24 h antes de iniciar los ensayos. La actividad de luciferasa y de β-galactosidasa se determinaron con kits adecuados (Steady-Glo® Luciferase Assay System. Promega, USA; β-Galactosidase Assay Kit, GE Healthcare, Argentina).

b. Ensayos utilizando plásmidos de expresión de la proteína de fusión pRFP-LC3

Un día antes de la transfección, se sembraron 5 x 105 células/pocillo en 0.75mL de medio DMEM suplementado con 10% SFB, y se las dejó crecer 24 horas sobre cubreobjetos de vidrio circulares dispuestos en placas de 12 pocillos. Al día siguiente se prepararó la mezcla con los plásmidos y la lipofectamina (1.6 µg pRFP-LC3 y 4 µl de lipofectamina por pocillo) y se transfectaron, según el protocolo descripto anteriormente. Los tratamientos se iniciaron 48hs post-transfección con un protocolo de fijación que consistió en incubar las células una solución de paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de un lavado con PBS 1X durante 5 minutos, se incubó las células con una solución de DAPI (0.5 µg/ml en PBS 1X) durante 10 minutos a temperatura ambiente, se realizó un nuevo lavado con PBS 1X y se colocaron los cubreobjetos sobre portaobjetos con medio de montaje acuoso para fluorescencia. Las muestras fueron preservadas en oscuridad hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia (BX-50, Olympus, Japón) con cámara incorporada (3CCD, Sony, Japón), asociado a una computadora que cuenta con un software de análisis de imágenes (Optimus, Media Cybernetics, Estados Unidos).

c. Tratamientos

c.1 Tratamientos con D-glucosa 10mM

Este grupo de tratamientos se llevó a cabo en medio F10 (Invitrogen, C.A.B.A., Argentina) sin el agregado de suero. La concentración de D-glucosa de este medio

de cultivo es de 5mM, y fue utilizada como concentración de referencia (control). Se preparó una solución *stock* de D-glucosa 100mM en medio F10 estéril sin suero, se la esterilizó por filtración y el día de cada experimento se realizaron diluciones de la misma para llegar a la concentración de trabajo (10mM). Los tratamientos con D-glucosa se realizaron durante 5 horas.

Para los experimentos de actividad del promotor de *Pomc*, se sembraron $5x10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos, se las transfectó según el protocolo antes mencionado, y se realizaron los tratamientos 24h post-transfección. Para los experimentos donde se analizó la generación de EROs, se sembraron $2.5x10^5$ células/pocillo en placas de 24 pocillos. Los tratamientos se iniciaron luego de 48h, y al finalizar la incubación, se reemplazó el medio de cultivo con una solución de DCF-DA (fluoróforo sensible a oxidación), según se describió en la sección de determinaciones de parámetros de estrés oxidativo.

c.2 Tratamientos con TNFα 100ng/ml

El TNFα utilizado en estos experimentos fue gentilmente provisto por la Dra Adalí Pecci. Se preparó la solución de trabajo en medio DMEM sin suero, en una concentración final de 100pg/ml y se incubaron las células con este medio durante 24h.

c.3 Tratamientos con inductores de autofagia y estrés oxidativo

Esta serie de ensayos se realizó en medio DMEM sin el agregado de suero. Se utilizó rapamicina como inductor de autofagia. La rapamicina regularía la autofagia inhibiendo la fosforilación de Atg13 y ULK1, proteínas involucradas en

la formación del autofagosoma, a través de efectos mediados por el complejo mTOR [145, 146]. Para los tratamientos se preparó una solución madre de rapamicina 10 mM en DMSO y se realizaron las diluciones correspondientes en medio DMEM sin el agregado de suero. Se incubaron las células durante 24h con 2 concentraciones de rapamicina (0.1μM y 0.5μM), o con DMEM sin suero como control.

Como inductor de estrés oxidativo se utilizó peróxido de hidrógeno (H2O2) en concentración de 1mM durante 3h.

c.4 Tratamientos con ácido palmítico (PA)

Para los experimentos con PA se preparó una solución madre disolviendo el ácido graso en etanol absoluto a una concentración final de 50mM (12.8mg/ml). El día de los experimentos, se conjugó el PA con BSA libre de ácidos grasos incubando el volumen necesario de la solución madre de PA con una solución de BSA al 4% p/v en DMEM sin el agregado de suero, durante 1 hora a 37°C. Se incubaron las células durante 24hs con concentraciones crecientes de PA (0.25mM – 1mM), o con BSA 4% como control.

En estos experimentos se sembraron $1x10^6$ células en medio DMEM suplementado con 10% SFB en placas de 6 pocillos. Luego de 48hs, se reemplazó el medio de cultivo por DMEM sin el agregado de suero. En los experimentos donde se analizaron niveles de expresión de proteínas, se trataron las células con buffer de lisis (PBS-Triton X-100 1%, cocktail de inhibidores de fosfatasas 0,5% y cocktail de inhibidores de proteasas 0,05%. Las proteínas obtenidas se cuantificaron por el método de Lowry y se analizaron por *western blot*.

Ninguno de los tratamientos mencionados modificó la viabilidad celular, evaluada por el método de exclusión de Azul de Tripán.

Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad de la distribución de los datos utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se expresan como media ± SEM. Las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante el test *t* de Student o por ANOVA seguido del test de Tukey o Dunnet, cuando correspondía. Todos los cálculos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.0c para Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, CA).

Resultados

Parte I: Efectos de la administración de DRS sobre la actividad del eje HHA

Con el fin de caracterizar distintos aspectos del desarrollo del modelo de IR por la administración de DRS evaluamos en primera instancia parámetros bioquímicos y hormonales en animales tratados con DRS durante 3, 7, 12 y 15 semanas. El análisis de los resultados obtenidos, según se muestran en la Tabla 5, indicó que los animales del grupo DRS mostraron mayores niveles séricos de glucosa, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados (AGNE) e insulina con respecto a sus respectivos controles en todas las semanas de tratamiento analizadas (Tabla 5).

	Semanas de Tratamiento			
	3	**7**	**12**	**15**
		Glucosa (mg/dL)		
Control	101.9±1.7	105.0±3.2	103.8±2.4	98.7±5.9
DRS	116.1±6.1	132.9±6.3	120.7±5.3	139.7±4.3
p	p<0.05	p<0.01	p<0.05	p<0.001
		Triglicéridos (mg/dL)		
Control	79.7±8.6	80.2±4.1	77.6±8.0	62.1±8.9
DRS	145.9±8.5	144.6±16.2	116.8±3.2	115.5±12.9
p	p<0.001	p<0.05	p<0.01	p<0.05
		AGNE(mM)		
Control	0.62±0.05	0.76±0.01	0.76±0.03	0.84±0.01
DRS	1.10±0.06	0.82±0.01	0.96±0.05	1.00±0.05
p	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
		Insulina (ng/ml)		
Control	0.99±0.01	0.79±0.03	0.98±0.01	0.99±0.02
DRS	1.97±0.05	2.26±0.04	1.93±0.07	2.32±0.02
p	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001

***Tabla 5*: Parámetros bioquímicos determinados en muestras de suero obtenidas a lo largo del tratamiento con DRS (de 3 a 15 semanas).** Los datos se muestran como media ± SEM, n=4, y fueron analizados por el Test *t* de Student para muestras no apareadas.

El análisis de la evolución del peso corporal en ambos grupos de animales indicó un aumento significativo en los animales tratados con DRS con respecto a los controles desde la semana 5 en adelante (Figura 13).

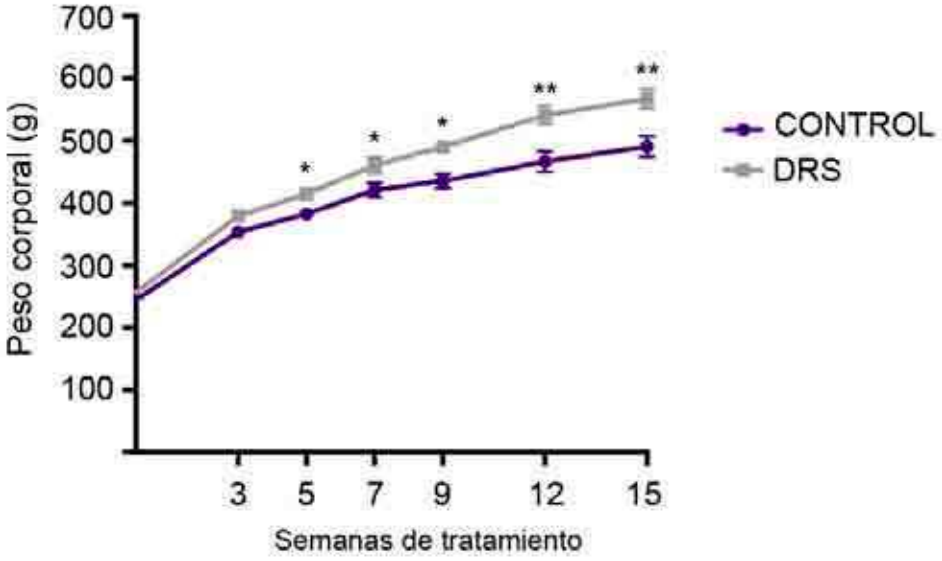


***Figura 13*: Evolución del peso corporal a lo largo del tratamiento con DRS (3 a 15 semanas).** Los datos se muestran como media ± SEM, n=4 animales por grupo, y fueron analizados por el Test *t* de Student. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ *vs*. grupo Control de cada semana.

Evaluamos la sensibilidad periférica a la insulina en estos animales, mediante una prueba de tolerancia a la hormona (0.8 UI/kg, i.p., ver Materiales y Métodos) luego de 3, 7 y 15 semanas de iniciado el tratamiento. Nuestros resultados mostraron una disminución significativa de la constante de desaparición de glucosa (k) en los animales alimentados con DRS durante 7 y 15 semanas (Figura 14).

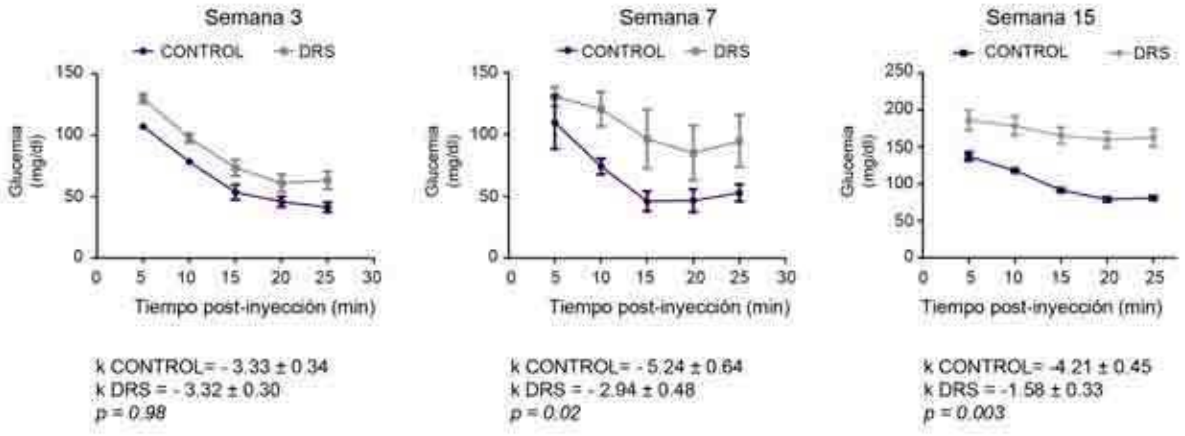
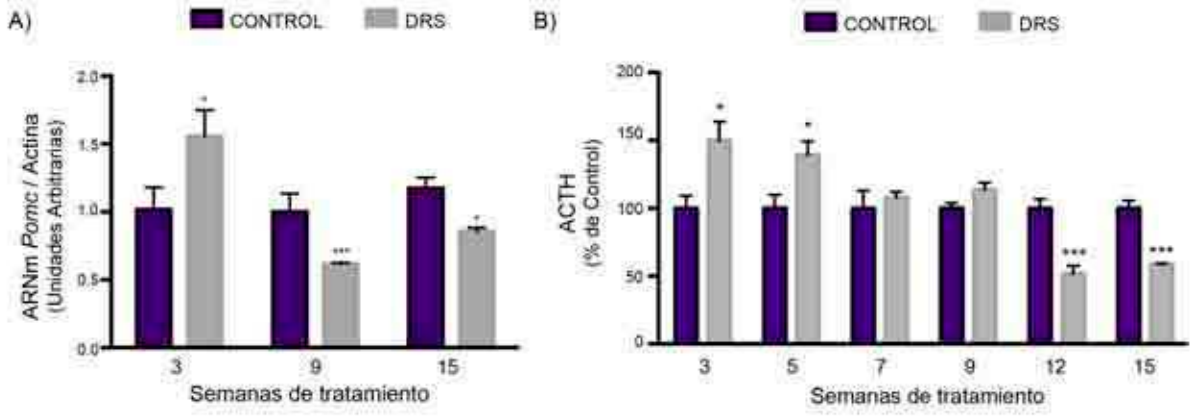


***Figura 14*: Sensibilidad a la insulina (0.8 UI/kg i.p.) en animales controles y tratados con DRS durante 3, 7 y 15 semanas.** Los datos se muestran como la glucemia media ± SEM, n=4 animales por grupo. Debajo de cada panel se indica la constante de desaparición de glucosa (k) correspondiente a cada grupo, calculada según se indica en la sección de Métodos. Los resultados se analizaron mediante el Test *t* de Student para datos no apareados. Se consideraron diferencias significativas cuando $p<0.05$ *vs.* grupo Control de cada semana.

A continuación, estudiamos la función adenohipofisaria. Evaluamos, en primer lugar, los niveles del ARNm que codifica para el péptido POMC en el tejido adenohipofisario, y la concentración sanguínea de la hormona ACTH. Como se puede observar en la Figura 15, los niveles de ARNm de *Pomc* fueron significativamente mayores en el grupo DRS con respecto al grupo control en la 3ra semana de tratamiento, mientras que la relación se invirtió en las semanas 9 y 15 (Figura 15 A). En concordancia con estos resultados, los niveles plasmáticos de ACTH fueron mayores en los animales tratados con DRS hasta la 5ta semana

y significativamente menores que los de sus pares del grupo Control en las determinaciones realizadas en las semanas 12 y 15 (Figura 15 B).



<u>Figura 15:</u> A) Expresión del ARNm de Pomc en AH de ratas controles o tratadas con DRS durante 3, 9 y 15 semanas, medidos por RT-qPCR. B) niveles plasmáticos de ACTH de ratas controles y tratadas con DRS, medidos por un método inmunométrico quimioluminiscente. Los datos se muestran como media ± SEM, n=4 animales por grupo, y fueron analizados por el Test *t* de Student. *p<0.05, ***p<0.001 *vs.* grupo Control de cada semana.

Adicionalmente se determinaron los niveles de glucocorticoides (GC) circulantes a lo largo del tratamiento. Los resultados indicaron que la corticosteronemia de los animales del grupo DRS fue significativamente mayor que la de sus respectivos controles en las semanas 3 y 5, mientras que en las semanas 12 y 15 los niveles de GC fueron significativamente menores (Figura 16).

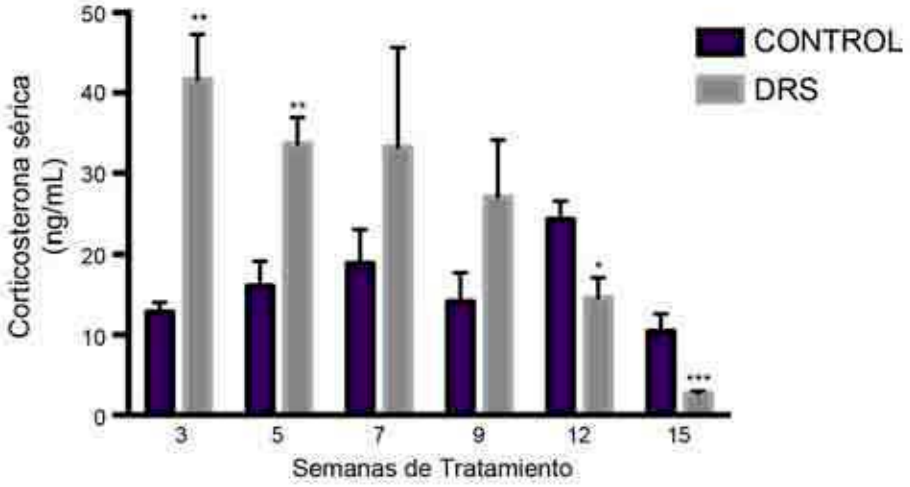


Figura 16*: *Corticosteronemia basal en animales de los grupos control o tratado con DRS. Las determinaciones se realizaron por radioinmunoensayo en muestras obtenidas en cada semana de tratamiento, según se detalla en Materiales y Métodos. Los datos se muestran como media ± SEM (n=4) y fueron analizados por el Test U de Mann-Whitney para muestras no apareadas. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ *vs.* grupo Control de cada semana.

Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos enfocar nuestro estudio en dos estadíos del desarrollo del síndrome de IR inducido por la ingesta de DRS analizando:

- los mecanismos subyacentes a la hiperactivación del eje HHA observada en una etapa temprana del tratamiento, en la que los animales aún no presentan alteraciones significativas en la prueba de tolerancia a la insulina *i.p.*, (semana 3, ver Resultados - Parte II),

- los mecanismos involucrados en la disfunción adenohipofisaria encontrada en ratas tratadas con DRS durante 15 semanas, con IR establecida (ver Resultados – Parte III).

Parte II: Estudio de los efectos tempranos del tratamiento con DRS sobre la función del eje HHA

I) Efecto del tratamiento con DRS sobre la función adenohipofisaria

Como se describió en la primera parte de este trabajo, los animales tratados con DRS durante 3 semanas mostraron una hiperactivación del eje HHA, evidenciada por un incremento en los niveles de ARNm de *Pomc* en adenohipófisis que se acompañaron de mayores niveles circulantes de ACTH y corticosterona.

El siguiente objetivo fue estudiar los mecanismos involucrados en esta hiperactivación, a nivel hipofisario.

En primer lugar evaluamos por *western blot* la expresión de ACTH en adenohipófisis de ratas controles (C) y tratadas con DRS (DRS) durante 3 semanas. En concordancia con los resultados obtenidos en las determinaciones plasmáticas, los niveles del péptido ACTH fueron mayores en las adenohipófisis del grupo DRS (Figura 17).

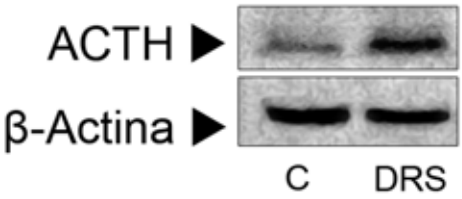


Figura 17: ***Efecto del tratamiento con DRS durante 3 semanas sobre los niveles proteicos de ACTH en adenohipófisis de rata.*** Se muestra el resultado de un *western blot* representativo.

Según se indica en la Introducción, la generación de estrés oxidativo (EOx) es uno de los posibles mecanismos subyacentes al aumento en la expresión de *Pomc* a nivel hipofisario. Se determinaron entonces parámetros indicadores de desbalance redox tisular y de la activación de la defensa antioxidante en adenohipófisis obtenidas de ratas controles y tratadas con DRS durante 3 semanas.

Los resultados indicaron un incremento tanto de los niveles de peróxidos lipídicos, determinados como TBARS (Figura 18A), como de la modificación de proteínas por nitración en residuos tirosina, determinada por *inmunoblot* utilizando un anticuerpo que reconoce residuos de tirosina nitrados (Figura 18B).

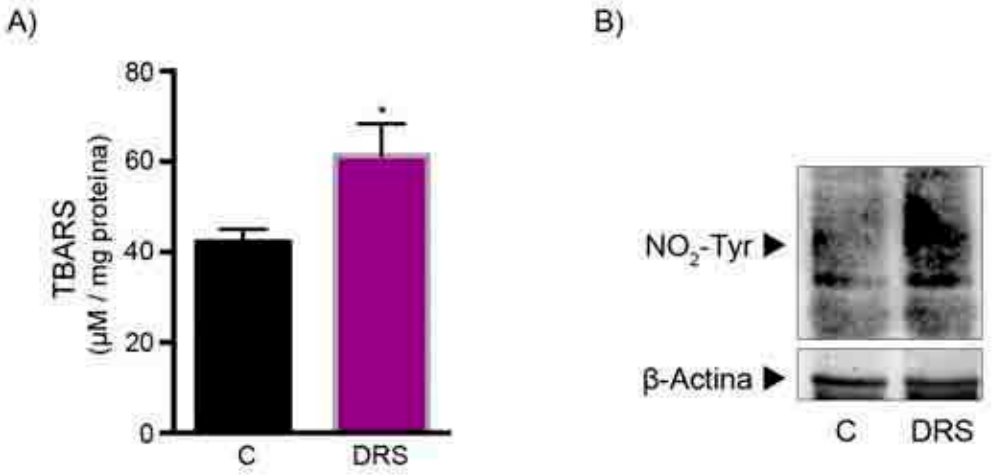


Figura 18: ***Parámetros de estrés oxidativo y nitrativo en adenohipófisis de ratas controles o tratadas con DRS durante 3 semanas.*** A) Niveles de lipoperóxidos (medidos como especies reactivas al ácido tiobarbitúrico o TBARS). Los datos se muestran como media ± SEM (n=5) y fueron analizados por el test *t* de Student para muestras no apareadas, $^{*}p<0.05$ *vs.* C. B) Niveles de proteínas nitradas en residuos tirosina (NO_2-Tyr). Se muestra el resultado de un *inmunoblot* representativo.

Respecto de los sistemas de defensa antioxidante, medimos la actividad de catalasa y evaluamos los niveles de expresión del sistema citoprotector de hemooxigenasa-1 (HO-1). Ambos parámetros se encontraron aumentados en las adenohipófisis de ratas tratadas con DRS durante 3 semanas con respecto a sus correspondientes controles (Figura 19 A y B).

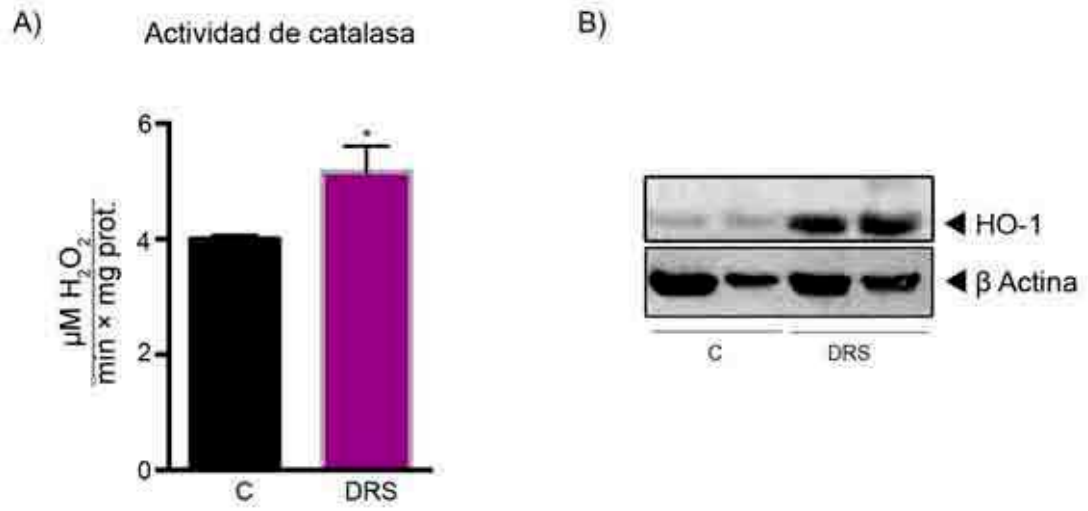
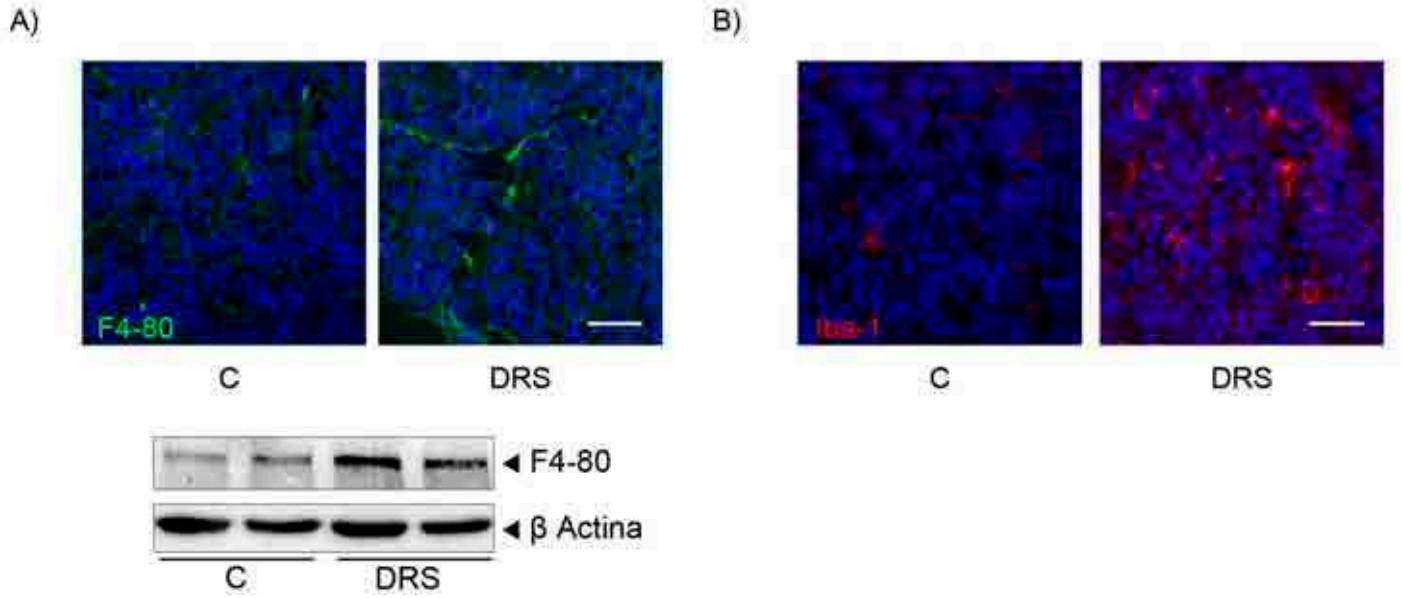


Figura 19: ***Sistemas antioxidantes en adenohipófisis de ratas controles o tratadas con DRS durante 3 semanas***. A) Actividad enzimática de catalasa. Los datos se muestran como media ± SEM (n=5) y fueron analizados por el test *t* de Student para muestras no apareadas, *p<0.05 *vs.* C. B) Niveles de expresión de HO-1. Se muestra el resultado de un *inmunoblot* representativo.

En suma, nuestros resultados sugieren que el consumo de DRS durante 3 semanas genera daño oxidativo e induce sistemas de defensa antioxidante a nivel adenohipofisario.

Dado que se ha asociado la generación de una respuesta inflamatoria con un desbalance redox tisular examinamos a continuación parámetros inflamatorios en el tejido adenohipofisario de ratas tratadas con DRS durante 3 semanas.

Se realizaron estudios por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos diseñados para detectar el marcador de macrófagos F4-80, y el marcador de células derivadas de monocitos Iba-1, y se analizaron los resultados con un microscopio de epifluorescencia. Las imágenes presentadas en la figura 20 muestran una mayor marcación para ambas moléculas, en adenohipófisis de ratas tratadas con DRS durante 3 semanas. En concordancia, se observó un aumento en los niveles del marcador F4-80, por *western blot*, en los tejidos obtenidos de animales tratados con DRS. Estos resultados sugieren un aumento en el número de macrófagos presentes en las adenohipófisis en estos animales.



***<u>Figura 20:</u>* Presencia de macrófagos en adenohipófisis de animales controles o tratados con DRS durante 3 semanas.** Inmunoreactividad para A) F4-80 (inmunofluorescencia, panel superior; *inmunoblot,* panel inferior) y B) Iba-1 (inmunofluorescencia). Barra = 50µm. Se muestran imágenes representativas. Aumento = 200X.

Los niveles de ARNm del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), una citoquina pro-inflamatoria, también mostraron un aumento significativo en las adenohipófisis de las ratas del grupo DRS (Figura 21).

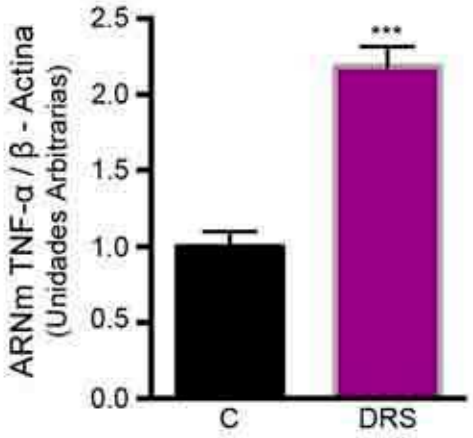


***Figura 21*: Expresión de TNF-α en adenohipófisis de ratas controles o tratadas con DRS durante 3 semanas medida por RT-qPCR y normalizada con β-actina.** Los datos se muestran como media ± SEM (n=4) y fueron analizados por el Test *t* de Student para muestras no apareadas ***p<0.001 *vs.* grupo Control (C).

En resumen, los resultados descriptos en esta sección indican que los animales tratados con DRS durante 3 semanas muestran un aumento en la síntesis y secreción de ACTH, que se acompaña de mayores niveles de marcadores de EOx y de sistemas de defensa antioxidante, con un aumento en el número de macrófagos en el tejido adenohipofisario. Dado que los resultados presentados sugieren la generación de EOx en las adenohipófisis de animales tratados con DRS durante 3 semanas evaluamos a continuación el efecto del tratamiento con antioxidantes sobre los cambios funcionales generados a nivel

adenohipofisario. Con este fin, se estudiaron los efectos de dos antioxidantes diferentes: ácido α-lipoico (ALA), y melatonina (MEL).

II) Efecto del tratamiento con ácido α-Lipoico (ALA) sobre la función adenohipofisaria de ratas tratadas con DRS

La administración de ALA se realizó en forma intraperitoneal (100mg/kg) cada 48h, durante las 3 semanas de tratamiento, en animales controles y que recibieron DRS. Los animales de los grupos sin ALA recibieron un tratamiento simulado con vehículo cada 48h.

Respecto de los parámetros bioquímicos analizados, el tratamiento con ALA no previno el aumento de los niveles de glucosa ni de TAG séricos generado por el consumo de DRS durante 3 semanas. El peso corporal, determinado al final del tratamiento, no fue significativamente diferente en ninguno de los grupos analizados (Tabla 6).

	C	DRS	ALA	DRS+ALA
TAG (mg/dl)	75.5±4.4	101.0±8.8***	76.0±12.4	148.3±20.8***
Glucosa (mg/dl)	93.3 ± 1.9	102.3 ± 1.9*	92.1 ± 2.8	104.1 ± 3.5*
Peso corporal (g)	312.9±7.5	315.9±8.5	308.9±5.2	310.0±6.0

Tabla 6: Parámetros séricos y peso corporal de ratas controles o tratadas con DRS durante 3 semanas, con o sin tratamiento antioxidante (ALA, ácido lipoico, 100mg/kg, i.p., cada 48hs). Los datos se muestran como media ± SEM (n=4) y fueron analizados por ANOVA seguido del test post hoc de Tukey, *$p<0.05$, ***$p<0.001$ *vs.* Control (C).

El análisis de los niveles de TBARS y de proteínas modificadas en tirosina (NO_2-Tyr), como marcadores de daño oxidativo y nitrativo respectivamente, indicó que el tratamiento con ALA no previno la inducción de estos procesos a nivel hipofisario (Figura 23).

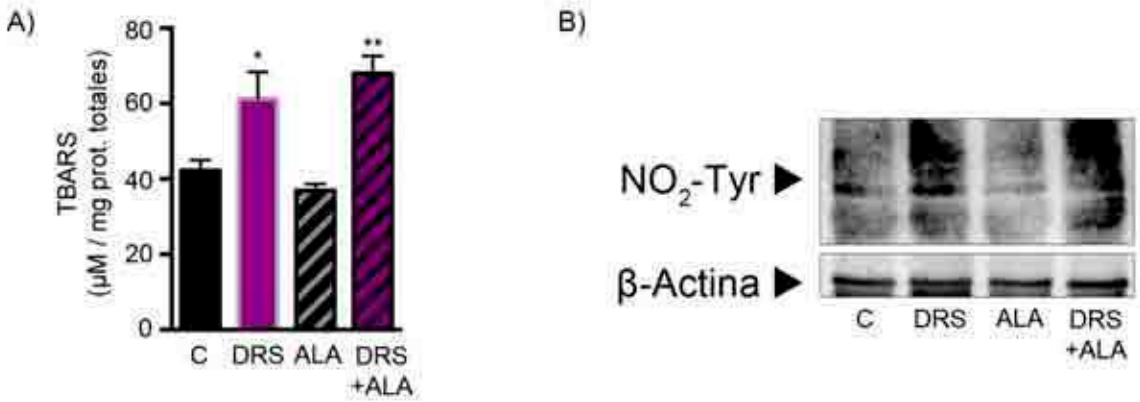


***Figura 23*: Parámetros de estrés oxidativo y nitrativo en adenohipófisis de animales controles y tratados con DRS y/o ALA (100mg/kg, i.p., cada 48hs.) durante 3 semanas**. A) Peróxidos lipídicos (como TBARS). Los datos se muestran como media ± SEM (n=4), y fueron analizados por ANOVA seguido del test de Tukey, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ *vs.* C. B) Proteínas modificadas en tirosina (NO_2-Tyr) fueron evaluadas por *inmunoblot.*

Sin embargo, el tratamiento con ALA previno la inducción de catalasa y HO-1 en las adenohipófisis de ratas tratadas con DRS durante 3 semanas (Figura 24).

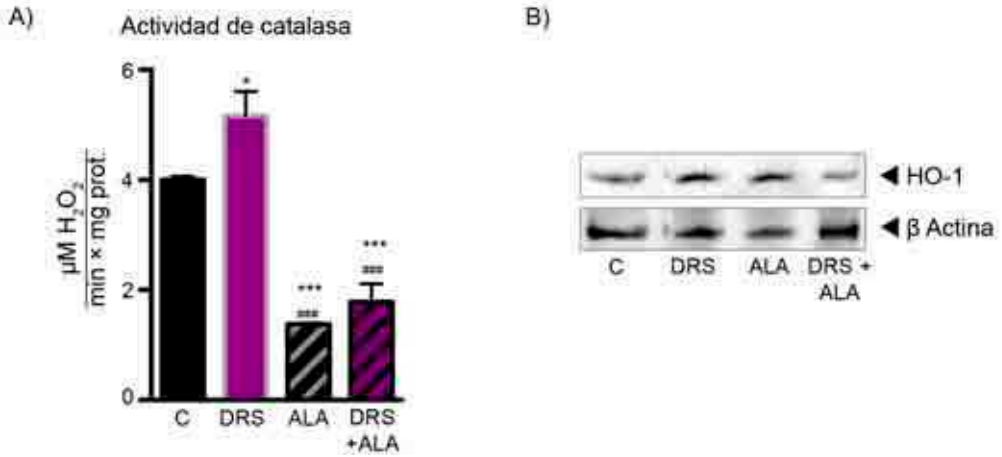


***Figura 24*: Sistemas de defensa antioxidante intracelular en adenohipófisis de animales controles y tratados con DRS y/o ALA (100mg/kg, i.p., cada 48h) durante 3 semanas**. A) Actividad de catalasa. Los datos se muestran como media ± SEM(n=4), y fueron analizados por ANOVA seguido del test de Tukey, $^{*}p<0.05$, $^{***}p<0.001$ vs. C; $^{\#\#\#}p<0.001$ vs. DRS. B) Niveles de expresión de HO-1. Se muestra el resultado de un *inmunoblot* representativo.

Adicionalmente, la figura 25 muestra que el tratamiento con ALA previno el incremento en el número de macrófagos en la AH, evaluada por los niveles de Iba-1 por inmunofluorescencia.

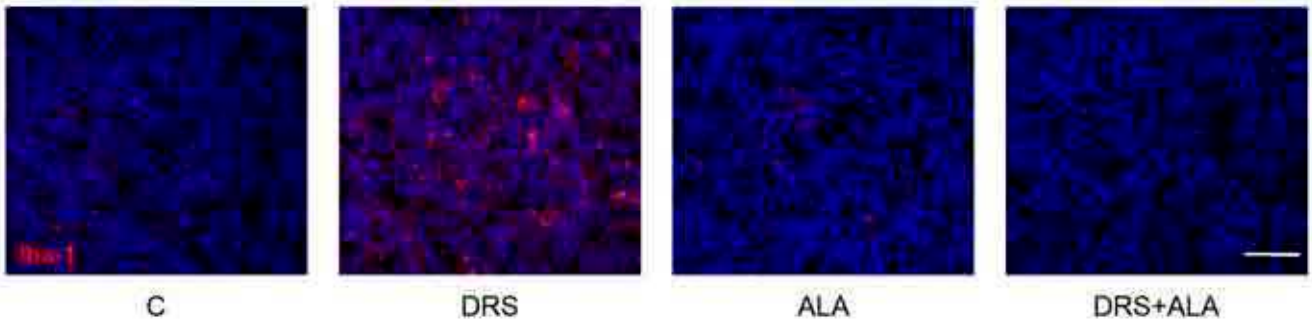
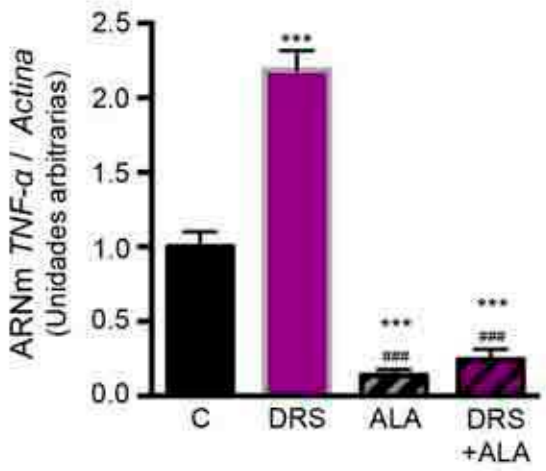


Figura 25: ***Inmunofluorescencia para Iba-1 en adenohipófisis de animales controles y tratados con DRS y/o ALA (100mg/kg, i.p., cada 48h) durante 3 semanas***. Barra = 50µm. Se muestran imágenes representativas.

Estos resultados son consistentes con los encontrados al analizar la expresión del ARNm de la citoquina pro-inflamatoria TNF-α en la AH, ya que el tratamiento con ALA previno el aumento de este parámetro observado en los animales tratados con DRS (Figura 26).



<u>Figura 26</u>: Expresión del ARNm de TNF-α en adenohipófisis de animales controles y tratados con DRS y/o ALA (100mg/kg, i.p., cada 48h) durante 3 semanas medida por qRT-PCR. Se utilizó la expresión de actina como normalizador. Los datos se muestran como media ± SEM(n=4), y fueron analizados por ANOVA seguido del test de Tukey, ***p<0.001 *vs.* C; ###p<0.001 *vs*. DRS.

En cuanto a los parámetros relacionados con la función adenohipofisaria, el tratamiento con ALA previno parcialmente el incremento de los niveles proteicos de ACTH observados en los animales del grupo DRS (Figura 27A). Sin embargo, el ALA indujo *per se* un incremento significativo de los niveles de ACTH adenohipofisarios y circulantes. No se observaron cambios en los niveles plasmáticos de ACTH entre el grupo ALA y el grupo DRS + ALA tras 3 semanas de la modificación dietaria (Figura 27B).

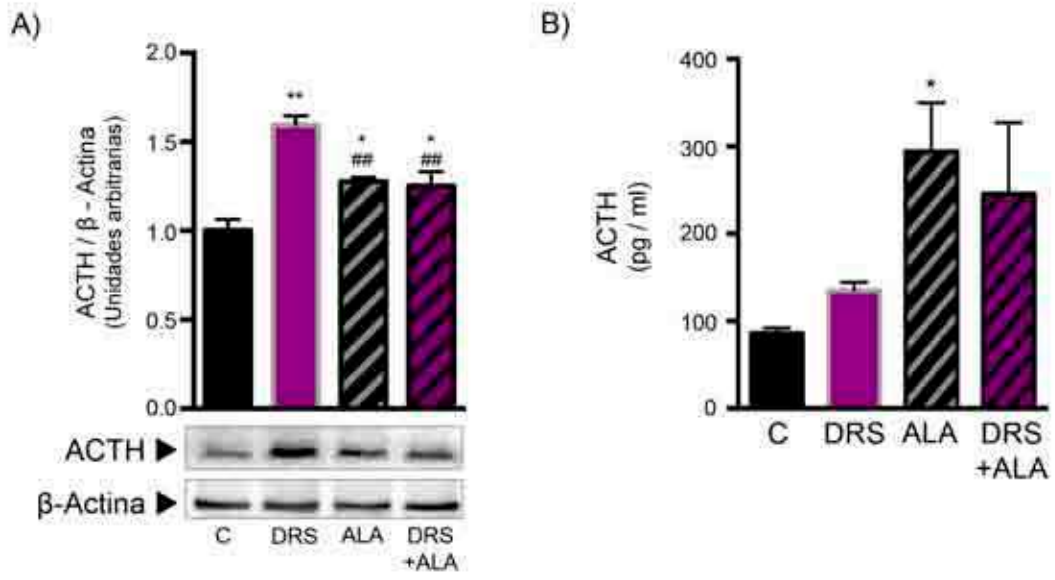
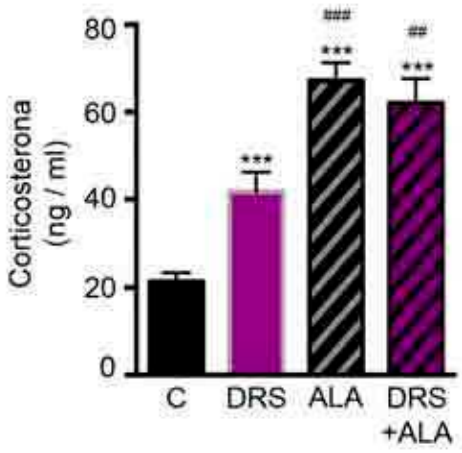


***Figura 27*: A) Expresión de ACTH en adenohipófisis, y B) niveles plasmáticos de ACTH, medidos por un método inmunométrico quimioluminiscente, en animales controles o tratados con DRS y/o ALA (100mg/kg, i.p., cada 48hs) durante 3 semanas.** Se muestra un *inmunoblot* representativo y el análisis densitométrico como media ± SEM (n=4). Los datos fueron analizados por ANOVA seguido del test de Tukey,$^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ *vs.* C; $^{\#\#}p<0.01$ *vs*. DRS.

Los animales tratados con ALA mostraron niveles significativamente mayores de GC séricos (con respecto a los grupos Control y DRS) y no se observaron diferencias entre ambos grupos de animales (ALA y DRS +ALA) (Figura 28).



<u>Figura 28:</u> Niveles de corticosterona sérica en ratas controles o tratadas con DRS durante 3 semanas, y con o sin tratamiento con ALA (100mg/kg, i.p., cada 48hs). Los resultados se muestran como media ± SEM (n=5) y fueron analizados por ANOVA seguido del test post hoc de Tukey, $^{***}p<0.001$ *vs*. C; $^{##}p<0.01$, $^{###}p<0.001$ *vs*. DRS.

En resumen, el tratamiento con ALA previno el incremento de parámetros de inflamación y la inducción de enzimas antioxidantes, mientras que no tuvo efecto sobre parámetros de estrés oxidativo y nitrativo. Tampoco previno la hiperactivación adenohipofisaria observada en los animales tratados con DRS durante 3 semanas.

III) Efecto del tratamiento con Melatonina sobre la sobre la función adenohipofisaria de ratas tratadas con DRS.

En los siguientes experimentos evaluamos el efecto de la melatonina, administrada mediante implantes subcutáneos, sobre los parámetros hipofisarios estudiados anteriormente en animales controles y tratados con DRS durante 3 semanas. Los animales del grupo control recibieron una operación simulada, omitiéndose la colocación de implante.

Respecto de los parámetros séricos analizados, la melatonina (MEL) no previno el aumento de glucosa, de TAG y de ácidos grasos no esterificados del plasma (AGNE), generado por el consumo de DRS durante 3 semanas. Por otro lado, el peso corporal al final del tratamiento no fue significativamente diferente en ninguno de los grupos analizados (Tabla 7).

	C	DRS	MEL	DRS+MEL
TAG (mg/dl)	75.5±4.4	101.0±8.8***	78.4±4.1	105.7±7.9*
Glucosa (mg/dl)	91.2±1.6	100.2±2.2**	87.2±5.3	104.5±5.9*
AGNE (mM)	0.62±0.05	1.10±0.06**	0.80±0.02	1.20±0.11**
Peso corporal (g)	330.5±8.8	356.8±20.7	317.0 ±31.0	329.5±30.0

Tabla 7: Parámetros séricos y peso corporal de ratas controles o tratadas con DRS y/o MEL (20mg de melatonina/implante) durante 3 semanas. Los datos se muestran como media ± SEM (n=4) y fueron analizados por ANOVA seguido del test post hoc de Tukey, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. Control (C)

Para evaluar la capacidad antioxidante del tratamiento con MEL a nivel adenohipofisario, estudiamos los niveles de lipoperóxidos (evaluados como TBARS) en este tejido. Como se observa en la figura 29, el tratamiento con melatonina previno el incremento en los niveles de TBARS observado en los animales del grupo DRS.

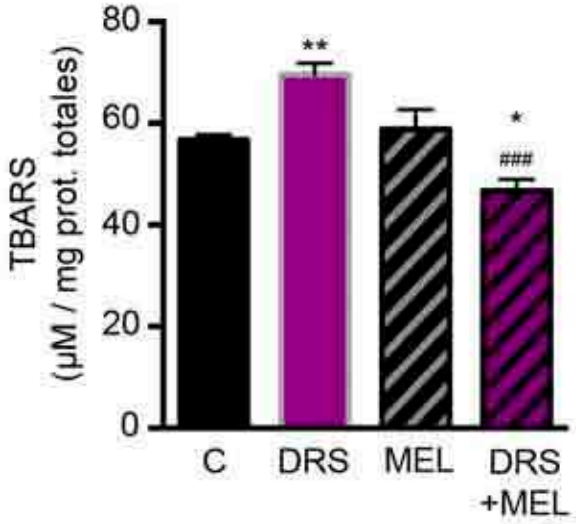


***Figura 29*: Niveles de lipoperóxidos como especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en adenohipófisis de ratas controles o tratadas con DRS y/o MEL (20mg/implante) durante 3 semanas.** Los datos se muestran como media ± SEM (n=4) y fueron analizados por ANOVA seguido del test de Tukey ($^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ *vs*. C; $^{\#\#}p<0.01$ *vs*. DRS).

El tratamiento con MEL previno tanto el aumento en la actividad enzimática de catalasa (Figura 30 A), como la inducción de HO-1 (Figura 30 B) observados en los animales tratados con DRS durante 3 semanas.

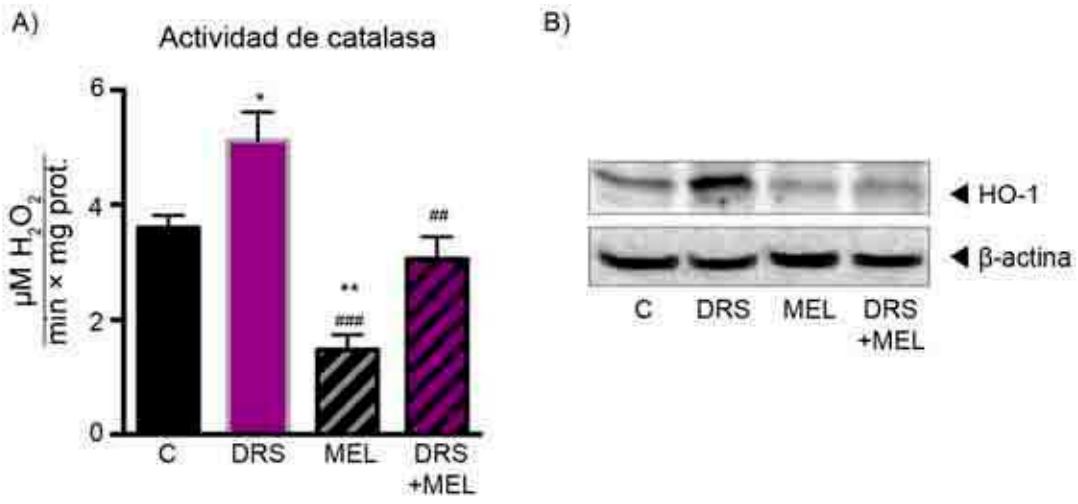


***Figura 30*: Actividad de catalasa (A) y niveles de expresión de HO-1 (B) en adenohipófisis de ratas controles o tratadas con DRS y/o MEL, durante 3 semanas.** Los datos se muestran como media ± SEM(n=4) y fueron analizados por ANOVA seguido del test de Tukey ($^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ *vs.* C; $^{\#\#}p<0.01$, $^{\#\#\#}p<0.001$ vs. DRS).

Respecto de la presencia de macrófagos en el tejido, los niveles del marcador F4-80 no se incrementaron en las adenohipófisis de los animales tratados con DRS y MEL (Figura 31).

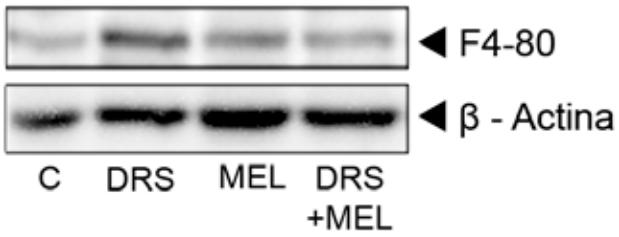


***Figura 31*: Expresión del marcador F4-80 en AH de animales controles o tratadas con DRS y/o MEL durante 3 semanas.** Se muestra el resultado de un *inmunoblot* representativo.

Finalmente, el análisis de los efectos del tratamiento antioxidante sobre la función adenohipofisaria indicó que la melatonina previno tanto el aumento de los niveles

proteicos de ACTH en adenohipófisis como el incremento de los niveles plasmáticos de la hormona inducidos por el consumo de DRS (Figura 32 A-B).

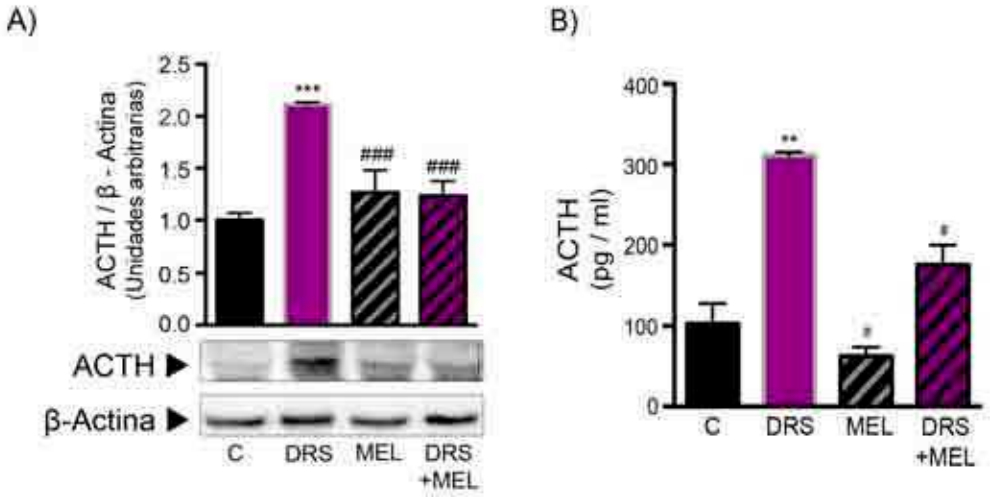


***Figura 32*: A) Expresión de ACTH en adenohipófisis medidos por inmunoblot y B) niveles plasmáticos de ACTH medidos por un método inmunométrico quimioluminiscente, de ratas controles o tratadas con DRS y/o MEL durante 3 semanas.** Se muestra el análisis densitométrico como media ± SEM(n=4). Los datos fueron analizados por ANOVA seguido del test de Tukey, $^{***}p<0.001$ *vs*. C; $^{###}p<0.001$ *vs*. DRS.

En concordancia, observamos también que el tratamiento con MEL previno el aumento de los niveles circulantes corticosterona en los animales tratados con DRS (Figura 33).

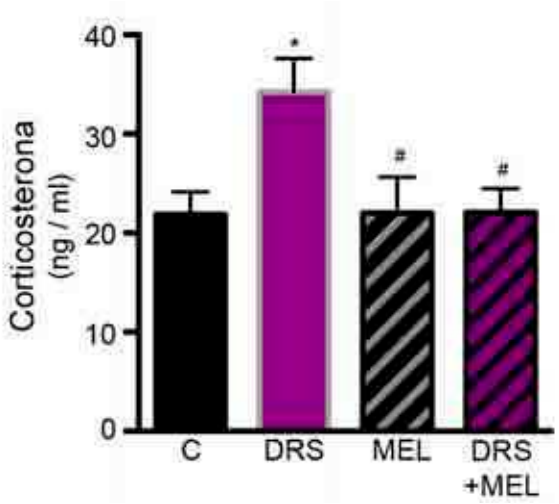


Figura 33: ***Niveles de corticosterona sérica, medida por RIA, en ratas controles o tratadas con DRS y/o MEL durante 3 semanas.*** Los resultados se muestran como media ± SEM (n=5) y fueron analizados por ANOVA seguido del test post hoc de Tukey, *p<0.05, **p<0.01 *vs.* C; #p<0.05 *vs.* DRS.

En resumen, los resultados muestran que la melatonina previno el daño oxidativo, la inducción de sistemas antioxidantes, el aumento de la población macrofágica adenohipofisaria y la disfunción adenohipofisaria inducida por la administración de DRS durante 3 semanas.

IV) Estudio de mecanismos regulatorios de la expresión de Pomc en células AtT-20: Rol del estrés oxidativo y la inflamación.

Con el fin de analizar los procesos subyacentes a la disfunción adenohipofisaria realizamos experimentos en las células corticotropas de la línea AtT-20, una línea celular ampliamente utilizada para el estudio de los mecanismos de regulación de la secreción de ACTH.

Evaluamos el efecto de la incubación con D-glucosa 10mM, concentración comparable con la glucemia de los animales tratados con DRS durante 3 semanas, en células AtT-20 transfectadas con un plásmido que contiene 708 pb del promotor de *Pomc* (de *Mus musculus*) clonado rio arriba del gen de luciferasa (plásmido reportero *Pomc*-luc). Como control en este grupo de experimentos, se utilizó medio sin el agregado de glucosa (C_f = 5mM). Nuestros resultados mostraron que la incubación con D-glucosa 10 mM, incrementó significativamente la actividad del promotor de *Pomc* en todos los intervalos estudiados (Figura 34).

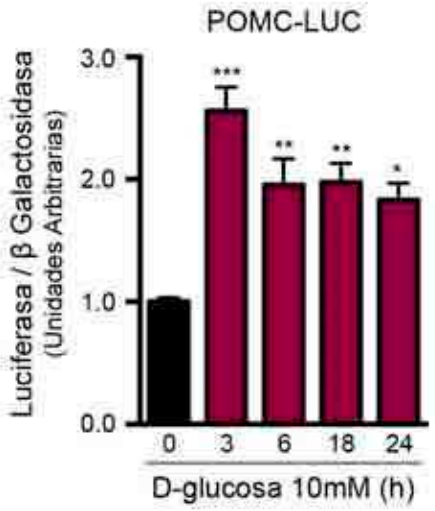


Figura 34: ***Efecto del tratamiento con D-glucosa sobre la actividad del promotor de Pomc en células AtT-20 transfectadas con Pomc-luc***. Los resultados de la actividad de luciferasa, normalizada con β-galactosidasa, se muestran como media ± SEM (n=5) y fueron analizados por ANOVA seguido del test post hoc de Dunnet, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ *vs*. D-glucosa 5mM.

A continuación estudiamos el efecto del tratamiento con D-glucosa sobre la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs), utilizando el reactivo diacetato de 2', 7' diclorofluoresceína (DCF-DA). Los resultados de la figura 35 muestran que el tratamiento con D-glucosa 10 mM durante 1 hora induce en forma transitoria y significativa la generación de EROs.

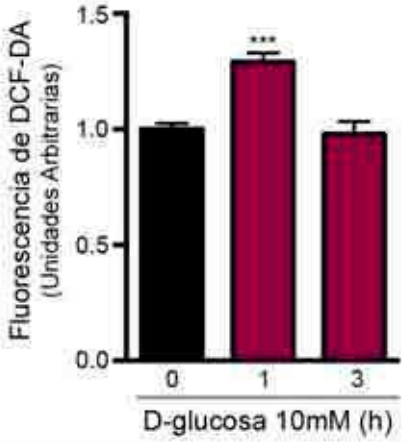
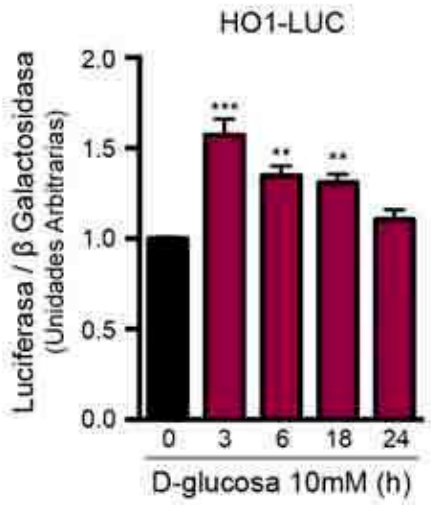


Figura 35: ***Efecto del tratamiento con D-glucosa 10 mM sobre la generación de EROs en células AtT-20.*** La fluorescencia generada por cada tratamiento, luego de 30 min de incubación con DCF-DA, se muestra como media ± SEM (n=4). Los datos fueron analizados por ANOVA seguido del test de Dunnet, $^{***}p<0.001$ *vs.* D-glucosa 5 mM.

Analizamos entonces el efecto del tratamiento con D-glucosa sobre la inducción del sistema antioxidante HO-1. Con este fin, transfectamos células de la línea AtT-20 con el plásmido reportero HO1-luc que contiene 4kb de la región promotora del gen murino de HO-1 (*hmox1*) clonados río arriba de la zona codificante de luciferasa. Los resultados mostraron un aumento significativo de la actividad de luciferasa del plásmido reportero cuando las células fueron tratadas con D-glucosa 10 mM por períodos entre 3 y 18h (Figura 36).



<u>Figura 35:</u> Efecto del tratamiento con D-glucosa sobre la actividad del promotor de HO-1 en células AtT-20 transfectadas con el plásmido HO1-luc. Los resultados se muestran como media ± SEM (n=5) y fueron analizados por ANOVA seguido del test post hoc de Dunnet, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ vs. D-glucosa 5mM.

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar la participación del estrés oxidativo en la inducción de *Pomc*. Para esto, transfectamos las células AtT-20 con el plásmido *Pomc*-luc y realizamos tratamientos con D-glucosa 10mM durante 3hs, en presencia o ausencia del antioxidante, N-acetil cisteína (NAC). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con NAC previno la inducción de *Pomc* generada por el tratamiento con D-glucosa 10mM, lo que sugiere la participación del estrés oxidativo en el efecto observado (Figura 36).

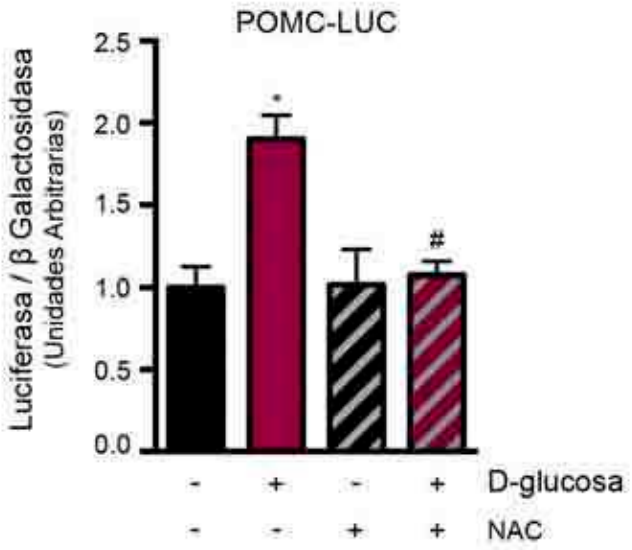


Figura 36: ***Efecto del tratamiento con D-glucosa (10mM) durante 3 horas sobre la actividad del promotor de Pomc, en presencia o ausencia de N-acetil cisteína (NAC, 100nM).*** Los resultados se muestran como media ± SEM (n=5) y fueron analizados por ANOVA seguido del test de Tukey, *p<0.05 *vs*. D-glucosa 5 mM; #p<0.05 *vs*. D-glucosa 10mM.

Por último, evaluamos la contribución de una citoquina pro-inflamatoria como el TNF-α sobre la regulación de la expresión de *Pomc* en las células AtT-20. Las células transfectadas con *Pomc*-luc fueron tratadas con TNF-α 100 pg/ml durante 24 h. Nuestros resultados muestran que esta citoquina no indujo la expresión de *Pomc* en corticotropos en cultivo (Figura 37 A). Como control positivo de este experimento, se muestran los resultados del mismo tratamiento en células AtT-20 transfectadas con un plásmido que contiene 5 sitios consenso de respuesta al factor de transcripción NFκB (kB-luc) (Figura 37 B).

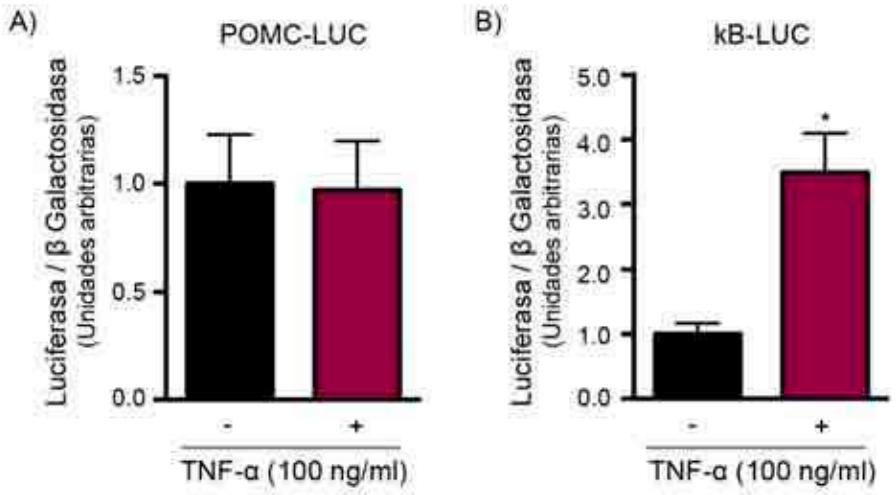


Figura 37: ***Efecto del tratamiento con TNF-α (100 ng/ml) durante 24 horas sobre la actividad del promotor de Pomc.*** Los resultados se muestran como media ± SEM (n=4) y fueron analizados por el test *t* de Student. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

En resumen, este grupo de resultados indica que uno de los mediadores humorales cuya concentración se encuentra aumentada en los sueros de ratas alimentadas con DRS durante 3 semanas, la glucosa, es capaz de incrementar la expresión de *Pomc* en células corticotropas en cultivo e inducir la generación de EROs y la expresión de sistemas antioxidantes como la HO-1. En ese sentido sugerimos la participación del estrés oxidativo en la inducción de *Pomc* por D-glucosa ya que el tratamiento antioxidante con NAC previno este efecto. También mostramos que el tratamiento con una citoquina pro-inflamatoria, TNF-α, cuya expresión encontramos aumentada en las adenohipófisis de las ratas del grupo DRS, no modificó la expresión de *Pomc* en las células en cultivo.

Parte III: Estudio de los efectos del consumo prolongado de DRS sobre el eje HHA

I) Efecto del tratamiento con DRS sobre la función adenohipofisaria

Según los resultados mostrados en la primera parte de este trabajo, la administración a ratas de una dieta rica en sacarosa durante un período prolongado de tiempo produce una disminución gradual en la actividad basal del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal evidenciada, entre las 12 y 15 semanas de tratamiento, por menores niveles circulantes de ACTH y, también de corticosterona.

Nos propusimos entonces investigar procesos celulares cuya alteración en diversos tejidos ha sido demostrada en modelos animales de IR y que, de inducirse también en las adenohipófisis de animales tratados con DRS durante 15 semanas, pudieran dar cuenta de los cambios observados en la secreción basal de ACTH.

En una primera serie de experimentos estudiamos los niveles de ARNm del precursor *Pomc*, y los niveles peptídicos de ACTH en adenohipófisis de ratas de los grupos controles sedentarios (C-S) y DRS sedentarios (DRS-S).

En concordancia con los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo, los niveles del ARNm de *Pomc* y del péptido ACTH se encontraron disminuidos en las adenohipófisis de ratas tratadas con DRS durante 15 semanas (Figura 38).

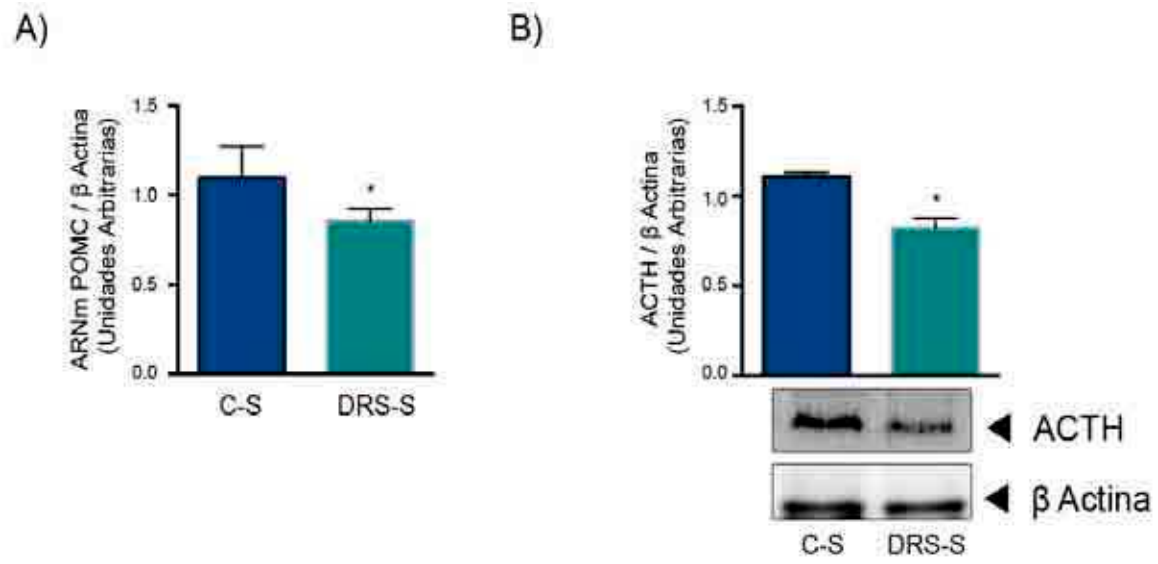
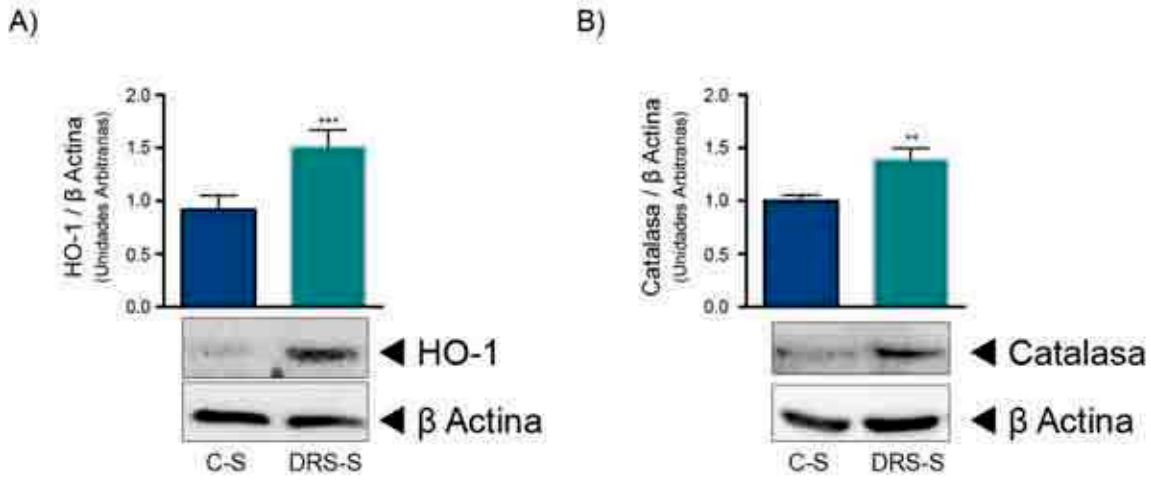


Figura 38: ***Efecto de la administración de una DRS durante 15 semanas sobre los niveles de ARNm de Pomc (A) y peptídicos de ACTH (B) en adenohipófisis.*** A) Los niveles de ARNm de *Pomc* se determinaron por qRT-PCR. Se utilizó la expresión de Actina como normalizador. B) Expresión del péptido ACTH. Se muestra una imagen representativa y la correspondiente cuantificación densitométrica, como media ± SEM, n=4, *p<0.05 *vs*. C-S, por el test *t* de Student.

A continuación estudiamos mecanismos que podrían estar involucrados en la inhibición de la expresión del precursor hormonal *Pomc*. Entre éstos, analizamos parámetros de estrés oxidativo, de estrés de retículo endoplasmático, de autofagia y de apoptosis en el tejido adenohipofisario de animales bajo tratamiento con DRS durante 15 semanas.

En respuesta al estrés oxidativo tisular, se observa normalmente un incremento en la expresión y actividad de los sistemas de defensa antioxidante. En concordancia, el análisis de los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes HO-1 y catalasa mostró un aumento significativo en las adenohipófisis de ratas del grupo DRS (Figura 39).



<u>Figura 39:</u> Niveles de expresión de (A) hemo oxigenasa-1 (HO-1) y (B) catalasa en adenohipófisis de ratas controles o tratadas con DRS durante 15 semanas. Se muestran *inmunoblots* representativos debajo de la cuantificación de las densitometrías correspondientes a n=4 animales por grupo. Los datos se indican como media ± SEM, n=4, $^{*}p<0.05$ *vs.* C-S, por el test *t* de Student.

Examinamos a continuación marcadores de la generación de estrés de RE en el tejido adenohipofisario de animales controles y alimentados con DRS durante 15 semanas. El incremento en los niveles de ARNm de los marcadores *Grp78* y de $p58^{IPK}$ (Figura 40), proteínas intermediarias pertenecientes a diferentes vías de señalización sugieren la inducción de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).

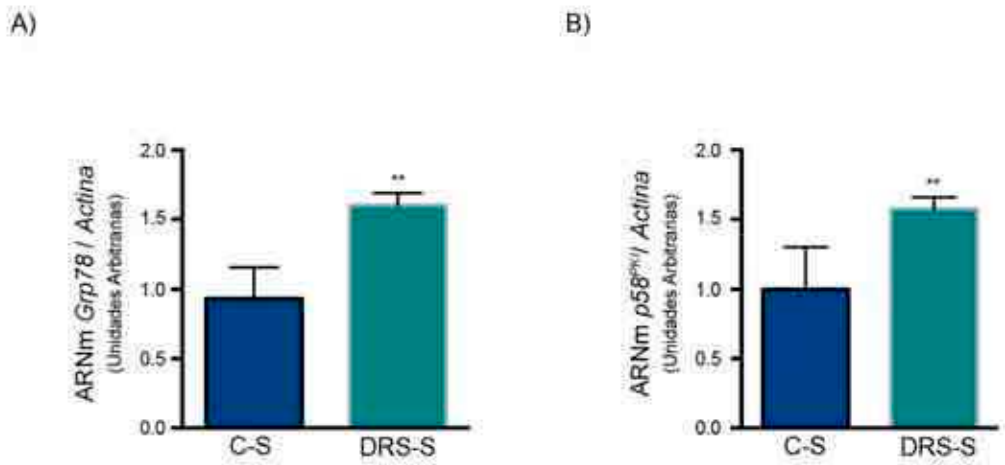
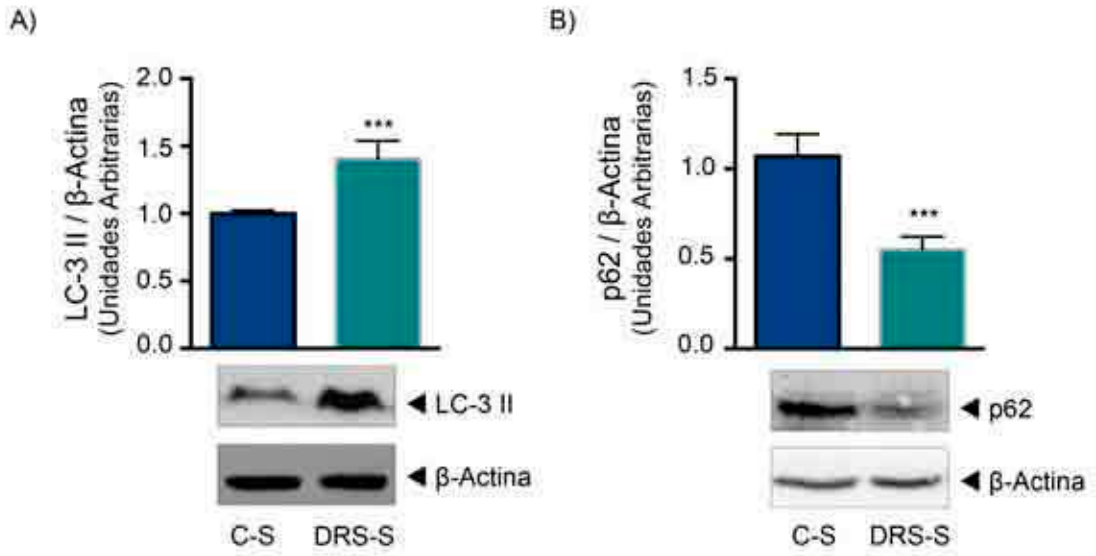


Figura 40: ***Niveles de expresión de (A) Grp78 y (B) p58^{IPK} en adenohipófisis de ratas controles o tratadas con DRS durante 15 semanas. Se utilizó la expresión de Actina como normalizador.*** Los resultados de la cuantificación por qRT- PCR en tiempo real se muestran como media ± SEM, n=4, $^{**}p<0.01$ *vs*. C-S, por el test *t* de Student.

En cuanto al proceso de autofagia, analizamos los niveles de expresión de las proteínas p62 y LC3 I y II y observamos un aumento significativo en la isoforma LC3-II (Figura 41 A) y una disminución en los niveles de p62 (Figura 41 B) en los tejidos provenientes de los animales del grupo DRS, lo que sugiere la activación del proceso autofágico en este tejido.



<u>Figura 41:</u> Niveles de expresión de (A) LC3-II y (B) p62 en adenohipófisis de ratas controles o tratadas con DRS durante 15 semanas. Se muestran *inmunoblots* representativos y los resultados de las densitometrías correspondientes a n=4 animales por grupo. Los datos se indican como media ± SEM, n=4, ***p<0.001 *vs.* C-S, por el test *t* de Student.

No detectamos modificaciones en los niveles de marcadores moleculares de apoptosis en adenohipófisis de ratas tratadas con DRS durante 15 semanas (datos no mostrados).

Los resultados mostrados en esta parte del trabajo sugieren que la administración de DRS durante 15 semanas produce cambios a nivel adenohipofisario, entre ellos la activación de procesos celulares como autofagia, estrés de RE y la inducción de sistemas de defensa antioxidante, que podrían estar relacionados con la disminución de la actividad endócrina del tejido.

II) Efecto del ejercicio moderado sobre la sobre la función adenohipofisaria de ratas tratadas con DRS.

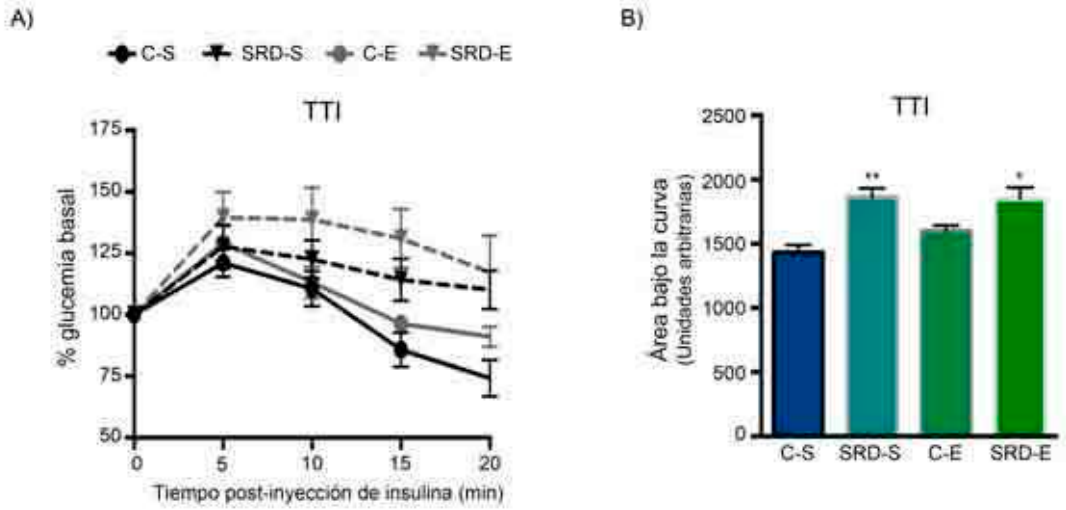
El ejercicio es una terapia ampliamente indicada para pacientes que presentan signos de síndrome metabólico e IR. En esta sección estudiamos el efecto de la aplicación de un protocolo de ejercicio moderado, que consistió en sesiones de hasta 15 minutos diarios sobre una cinta caminadora, 5 veces por semana a una velocidad de 0.8 km/h (ver Materiales y Métodos), sobre la función hipofisaria. Analizamos los parámetros bioquímicos y biométricos que encontramos alterados en los animales que consumieron DRS durante 15 semanas. Los resultados, mostrados en la tabla 8, indican que de los parámetros estudiados, el ejercicio moderado (E) sólo previno el aumento en los AGNE, generado por el consumo de DRS.

	C-S	DRS-S	C-E	DRS-E
TAG séricos (mg/dl)	61.0±4.4	103.8±5.6**	64.5±1.9	102.0±3.9*
Glucosa sérica (mg/dl)	98.7±5.9	139.7±4.3***	99.6±6.4	133.7±5.5**
AGNE plasmáticos (mM)	0.84±0.01	1.00±0.05**	0.57±0.01*	0.79±0.06##
Peso corporal (g)	302.8±16.6	367.4±12.2*	301.5±7.8	368.2±16.9*
Grasa retroperitoneal (g)	11.8±0.8	26.9±1.4***	11.2±0.9	27.0±2.3***
Grasa visceral (g)	11.4±0.7	21.0±0.9**	12.5±0.9	18.7±2.7*
Grasa epididimal (g)	11.6±0.9	21.0±0.2***	12.0±0.5	16.8±2.5*
Consumo calórico medio (kcal/rata/día)	142.6±2.7	206.0±6.4***	143.0±3.5	199.3±5.7***

Tabla 8: ***Parámetros bioquímicos séricos y biométricos de ratas controles o tratadas con DRS durante 15 semanas, y que realizaron o no ejercicio moderado.*** Los datos se muestran como media ± SEM (n=5) y fueron analizados por ANOVA seguido del test post hoc de Tukey, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 *vs.* C-S, ##p<0.01 *vs.* DRS-S.

El ejercicio moderado no previno la disminución de la sensibilidad periférica a la insulina generada por el consumo de DRS, medida en la 15ava semana de tratamiento mediante el test de tolerancia a la insulina (TTI) (Figura 42). La figura 42 A muestra la curva promedio de desaparición de glucosa luego de la inyección de insulina (0.8 UI/kg, i.p.). Se muestra también el promedio grupal de las áreas bajo las curvas obtenidas para cada sujeto experimental (Figura 42 B).

Nuestros resultados muestran que el consumo de DRS disminuye significativamente la pendiente (k) de la curva de desaparición de glucosa, y que el ejercicio moderado no previene la alteración en la sensibilidad periférica a la insulina (**k**: C-S: 4.2±0.4, DRS-S: 1.6±0.3**, C-E: 3.9±0.4, DRS-E: 2.5±0.3*, analizado por ANOVA seguido del test de Tukey, *p<0.05, **p<0.01 *vs.* C-S). Resultados similares se obtuvieron considerando el área bajo la curva de desaparición de glucosa (Figura 42 B).



<u>Figura 42</u>: Test de tolerancia a la insulina (TTI) de ratas controles o tratadas con DRS durante 15 semanas, y que realizaron o no ejercicio moderado. A) Curvas promedio de desaparición de glucosa luego de la inyección de insulina (*0.8 UI/kg, i.p.)*. Se calculó la pendiente k entre los 5 y los 20 minutos posteriores a la administración (ver valores en el

texto). Los datos se muestran como media ± SEM (n=5), y fueron analizados por ANOVA seguido del test post hoc de Tukey, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ *vs*. C-S.

En cuanto a la función del eje HHA, los resultados obtenidos indican que el ejercicio moderado previno las alteraciones funcionales causadas por el consumo prolongado de DRS en los niveles de expresión de *Pomc*, los niveles circulantes de ACTH y la corticosteronemia, evaluados 48 h después de la última sesión de ejercicio. (Figura 43).

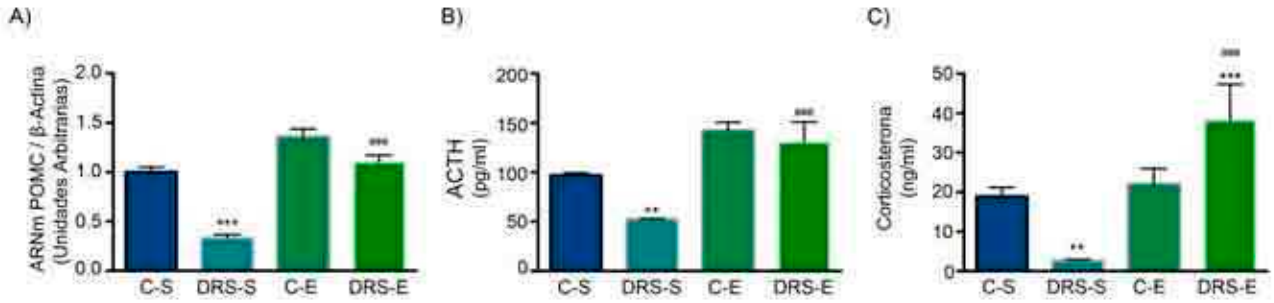


Figura 43: ***A) Niveles de ARNm de Pomc en adenohipófisis medidos por qRT-PCR, (B) concentración plasmática de ACTH medidos por enzimoinmunoensayo quimioluminiscente y (C) niveles de corticosterona sérica medidos por RIA, de ratas controles o tratadas con DRS durante 15 semanas, con o sin la implementación de un protocolo de ejercicio moderado.*** Los resultados se muestran como media ± SEM (n=5) y fueron analizados por ANOVA seguido del test post hoc de Tukey $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ *vs*. C-S; $^{###}p<0.001$ vs. DRS-S.

Con el fin de determinar si alguno de los tratamientos afecta el número de corticotropos adenohipofisarios se evaluó por inmunofluorescencia el número de células que expresan el péptido ACTH. Ninguno de los tratamientos (DRS y/o E) modificó la cantidad de células productoras de esta hormona (Figura 44).

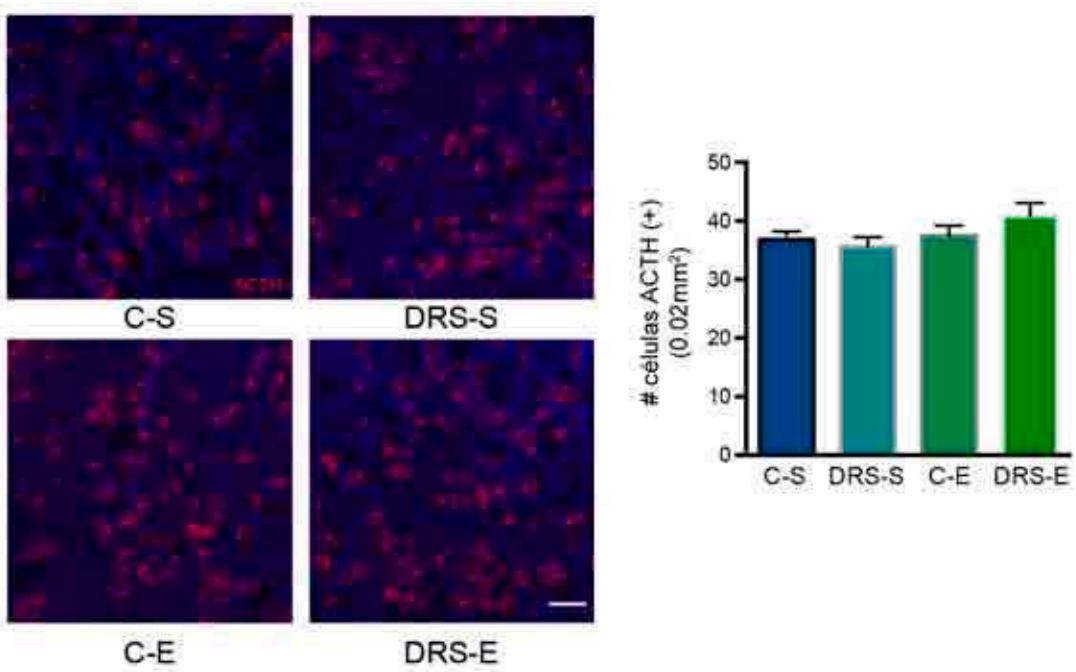


***Figura 44*: Análisis del número de células inmunopositivas para el péptido ACTH a nivel adenohipofisario.** Se realizaron inmunomarcaciones contra el péptido ACTH en adenohipófisis de ratas controles o tratadas con DRS durante 15 semanas, y que realizaron o no ejercicio moderado. Inmunomarcacion para ACTH (rojo) y tinción nuclear con Hoechst 33342 (azul). Se cuantificaron 12 fotografías por tratamiento (área: 0.02mm^2) utilizando el programa Image J. Los datos se muestran como media ± SEM, y fueron analizados por ANOVA. La barra blanca equivale a 30µm.

A continuación estudiamos el efecto del ejercicio moderado sobre la expresión de los marcadores de los procesos celulares que encontramos afectados en los animales del grupo DRS (sistemas antioxidantes, marcadores de autofagia y de estrés de RE). Comprobamos en primer lugar, que el ejercicio moderado evitó la inducción de las enzimas antioxidantes en las adenohipófisis de los animales tratados con DRS (Figura 43).

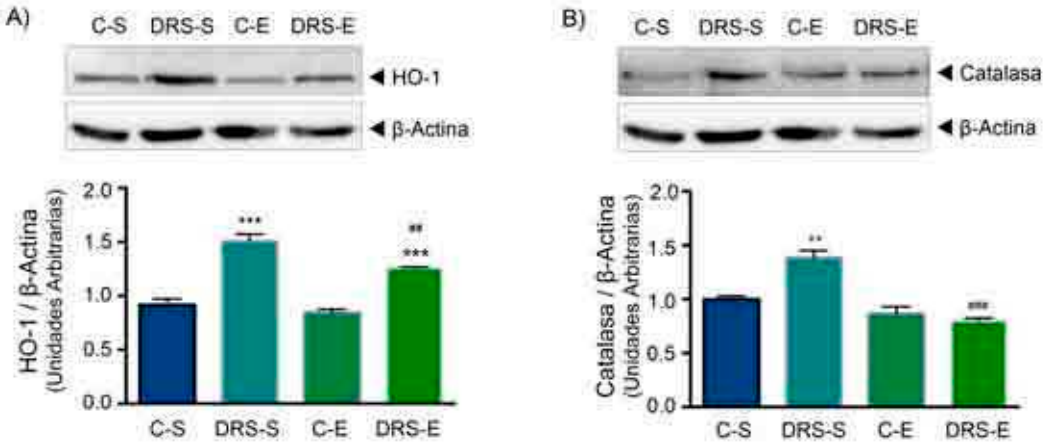


Figura 43: ***Niveles de expresión de (A) HO-1 y (B) catalasa de ratas tratadas controles o tratadas con DRS durante 15 semanas, con o sin la implementación de un protocolo de ejercicio moderado.*** Se muestran *inmunoblots* representativos sobre las densitometrías correspondientes a n=5 animales por grupo, normalizadas con β-actina. Los resultados se muestran como media ± SEM (n=5) y fueron analizados por ANOVA seguido del test post hoc de Tukey,$^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ *vs.* C-S; $^{\#\#}p<0.01$, $^{\#\#\#}p<0.001$ *vs.* DRS-S.

En cuanto a los marcadores moleculares de autofagia en tejido adenohipofisario los resultados obtenidos sugieren que la inducción de este proceso, al igual que la disfunción adenohipofisaria y la inducción de enzimas antioxidantes, fue prevenida por el protocolo de ejercicio moderado (Figura 44).

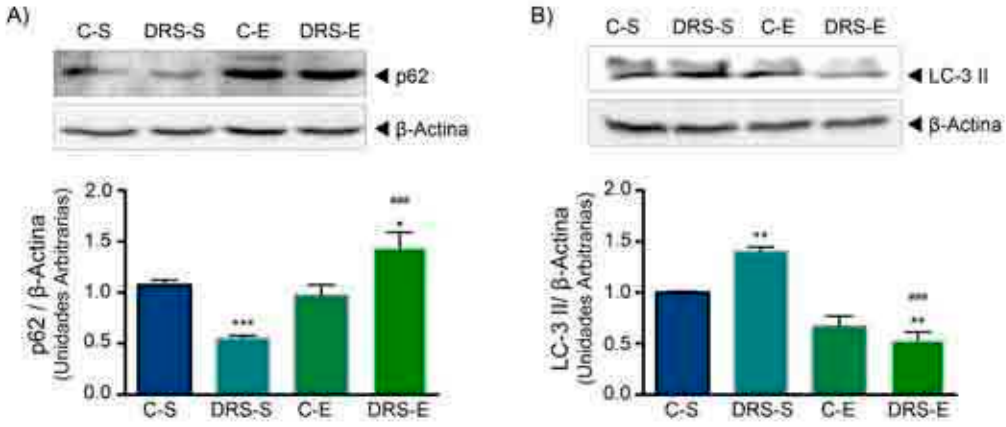
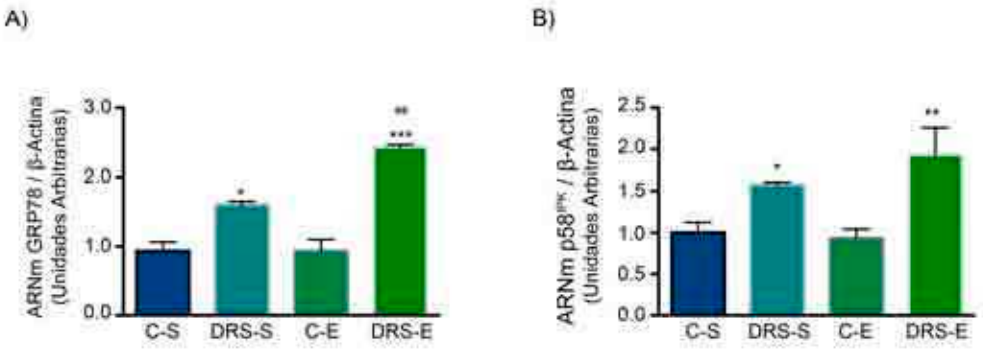


Figura 44: ***Niveles de expresión adenohipofisaria de (A) p62 y (B) LC3-II de ratas controles o tratadas con DRS durante 15 semanas, con o sin la implementación de un***

protocolo de ejercicio moderado. Se muestran *inmunoblots* representativos bajo las densitometrías correspondientes a n=5 animales por grupo normalizadas, con β-actina. Los resultados se muestran como media ± SEM (n=5) y fueron analizados por ANOVA seguido del test post hoc de Tukey ($^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ *vs*. C-S; $^{###}p<0.001$ *vs*. DRS-S).

Por el contrario, el estudio de los marcadores moleculares de estrés de RE indicó que el ejercicio moderado no afectó la respuesta a proteínas mal plegadas inducida por la ingesta de DRS (Figura 45).



***<u>Figura 45:</u>* Niveles de ARNm de (A) Grp78 y (B) p58^{IPK} en adenohipófisis de ratas controles o tratadas con DRS durante 15 semanas, con o sin la implementación de un protocolo de ejercicio moderado.** Los resultados se muestran como media ± SEM (n=5) y fueron analizados por ANOVA seguido del test post hoc de Tukey, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ *vs*. C-S; $^{##}p<0.01$ *vs*. DRS-S.

En resumen, los resultados obtenidos en esta sección sugieren una correlación inversa entre los niveles de *Pomc* y ACTH y la inducción de sistemas de defensa antioxidante y de autofagia. Según nuestros resultados, las alteraciones sobre los niveles de expresión de *Pomc* y la secreción de ACTH serían independientes de la inducción de estrés de RE en las adenohipófisis de ratas tratadas con DRS.

III) Efecto de la inducción de estrés oxidativo y autofagia sobre los niveles de expresión de Pomc/ACTH en la línea celular AtT-20

Dado que nuestros resultados sugieren una correlación entre el desbalance redox, la inducción de autofagia a nivel hipofisario y la hipofunción del eje HHA, nos propusimos investigar los mecanismos subyacentes utilizando la línea corticotropa AtT-20.

En primer lugar, estudiamos el efecto de la inducción de la autofagia sobre la transcripción del gen *Pomc*, utilizando células transfectadas con el plásmido *Pomc*-luc. Con este fin utilizamos el tratamiento con rapamicina, que inhibe la actividad del complejo mTOR y ha sido ampliamente utilizada en la bibliografía como un inductor de autofagia. La figura 46 muestra que el tratamiento con rapamicina inhibió la actividad de luciferasa de *Pomc*-luc, lo que sugiere la participación del proceso autofágico en la regulación de la expresión de *Pomc*.

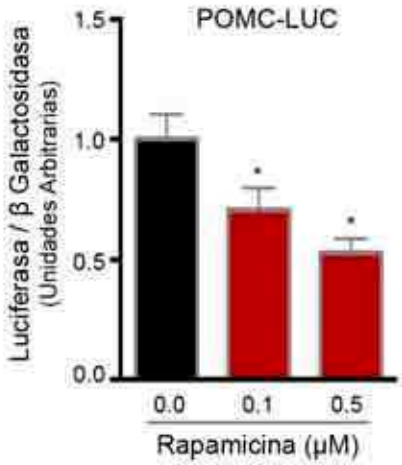


Figura 46: ***Efecto de la inducción de autofagia sobre la actividad del plásmido Pomc-luc.*** Las células AtT-20 fueron transfectadas con *Pomc*-luc y tratadas durante 24 h con concentraciones crecientes de rapamicina. La actividad de luciferasa, normalizada con la de β-galactosidasa se muestra como media ± SEM (n=5). Los resultados se analizaron por ANOVA seguido del test post hoc de Dunnet,*$p<0.05$ *vs*. rapamicina 0μM.

Evaluamos a continuación la participación del estrés oxidativo sobre la actividad del promotor de *Pomc* analizando el efecto del peróxido de hidrógeno en el mismo sistema. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con H_2O_2 1mM durante 3 horas inhibió la actividad de luciferasa del plásmido *Pomc*-luc, sugiriendo la regulación de la expresión de *Pomc* por EROs (Figura 47).

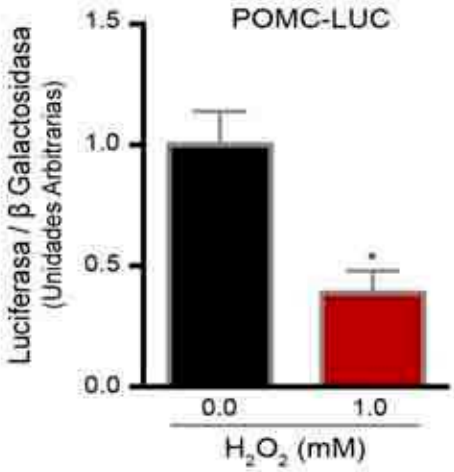


Figura 47: ***Efecto de la generación de ROS sobre la actividad de luciferasa en células AtT-20 transfectadas con Pomc-luc e incubadas durante 3 horas en presencia o ausencia de H_2O_2 1mM.*** La actividad de luciferasa, normalizada con la de β-galactosidasa se muestra como media ± SEM (n=5), y fueron analizados por el test *t* de Student,*$p<0.05$ *vs*. H_2O_2 0mM.

Ninguno de los tratamientos descriptos (rapamicina, H_2O_2) modificó la viabilidad de las células AtT-20, evaluada mediante el método de exclusión de Azul de Tripán (datos no mostrados).

IV) Efecto del ácido palmítico sobre los niveles de expresión de Pomc/ACTH en células AtT-20

Dado que en las ratas tratadas con DRS observamos un aumento en los niveles de AGNE, que fue prevenido por el ejercicio moderado, nos planteamos estudiar el rol de los ácidos grasos en la modulación de la expresión de *Pomc* en células corticotropas. En estos experimentos utilizamos un ácido graso saturado, el ácido palmítico (C16:0), que se encuentra en alta proporción en la fracción de AGNE del plasma. Los experimentos se llevaron a cabo incubando células *AtT-20* durante 24 horas con ácido palmítico (PA) conjugado con albúmina bovina (BSA 4%), según se describe en Materiales y Métodos. La figura 48 muestra que el tratamiento con PA inhibe la actividad de luciferasa de células transfectadas con *Pomc*-luc (Figura 48 A), y la expresión endógena del péptido POMC medida por *inmunoblot* (Figura 48 B).

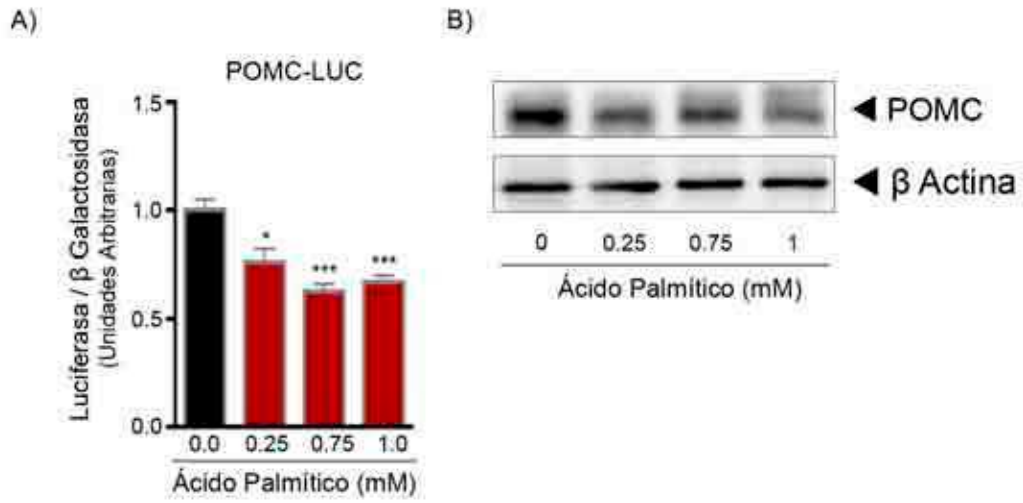


Figura 48: ***Efecto del tratamiento con ácido palmítico (PA, 24h) sobre la actividad de luciferasa de células AtT-20 transfectadas con Pomc-luc (A) y sobre la expresión endógena de POMC, medida por inmunoblot (B).*** Los resultados de actividad de luciferasa fueron normalizados con los valores de actividad de β-galactosidasa y se muestran como media ± SEM (n=5) y fueron analizados por ANOVA seguido del test de Dunnet, $^{*}p<0.05$, $^{***}p<0.001$ *vs*. PA 0 mM.

Evaluamos a continuación los procesos de autofagia y la inducción de estrés oxidativo en células incubadas en presencia de PA. Para esto, luego de la incubación con PA por 24 h evaluamos el procesamiento post-traduccional de LC-3 y su distribución subcelular (formación de *puncta*). La figura 49 muestra que el tratamiento con PA induce el clivado de la proteína LC-3, medido por *inmunoblot* (Figura 49A). Este tratamiento también induce la formación de autofagosomas, evaluada mediante cambios en la distribución sub-celular de la proteína LC3 en células transfectadas con un plásmido de expresión constitutiva que expresa la proteína LC3 fusionada con la proteína roja fluorescente RFP (Figura 49 B).

Concluimos entonces que el tratamiento con PA durante 24 horas induce autofagia en las células AtT-20.

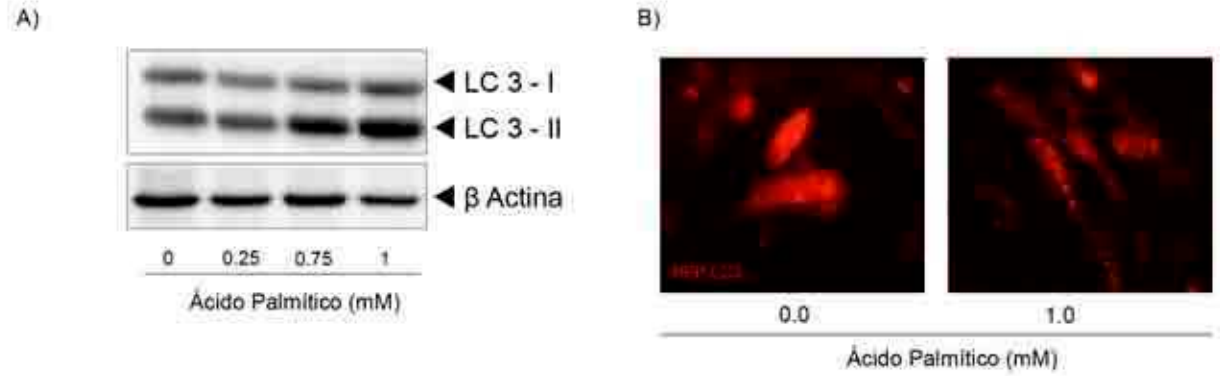


Figura 49: ***Efecto del tratamiento con ácido palmítico (PA, 24h) sobre (A) el procesamiento post-traduccional de la proteína LC-3 y (B) la distribución subcelular de la proteína de fusión RFP-LC3.*** Se transfectaron células AtT-20 con el plásmido pmRFP-LC3, que expresa la proteína roja fluorescente (RFP) fusionada con LC3. Luego de 48h de la transfección, se iniciaron las incubaciones en presencia de BSA 4% ± PA 1mM. Terminados los tratamientos, se realizó la fijación de las células y se tomaron imágenes en un microscopio de epifluorescencia. Se muestran imágenes representativas del clivado de la proteína LC3 endógena y de la distribución subcelular de RFP-LC3.

Con el fin de estudiar la generación de EROs, tratamos células *AtT-20* con PA durante 24 h, y terminados los tratamientos las incubamos con 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA). La figura 50 muestra que el tratamiento con PA 1mM durante 24 horas aumenta la generación de EROs en células *AtT-20*.

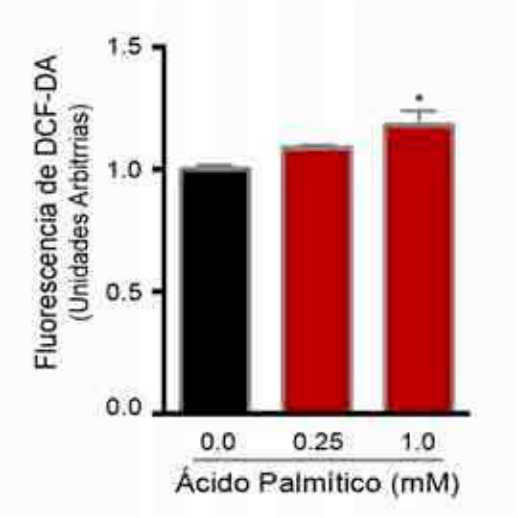


Figura 50: ***Efecto del tratamiento con ácido palmítico (PA, 24h) sobre la generación de EROs.*** Los resultados de las determinaciones de fluorescencia luego de 30 min de incubación con DCF-DA se muestran como media ± SEM (n=5) y fueron analizados por ANOVA seguido del test de Dunnet, $^{*}p<0.05$ *vs*. PA 0 mM.

En conclusión, los resultados de los experimentos realizados con las células corticotropas sugieren que el tratamiento con PA induce autofagia y estrés oxidativo y, a la vez, inhibe la expresión de *Pomc*. Con el objetivo de establecer si existe una relación causal entre estos factores, tratamos células con PA (durante 24h), en presencia de inhibidores de autofagia o de estrés oxidativo y analizamos la actividad del plásmido reportero *Pomc*-luc. Tanto el bloqueo de la autofagia con el inhibidor LY294002, como la inhibición del estrés oxidativo por el antioxidante N-acetil cisteína (NAC) previnieron el efecto del tratamiento con PA sobre la actividad de luciferasa en células transfectadas con *Pomc*-luc (Figura 51).

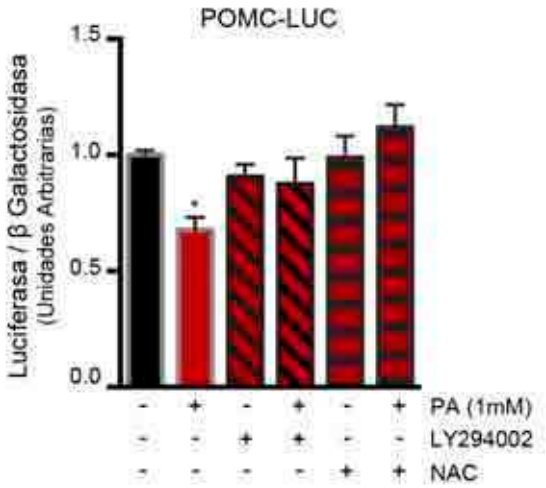


Figura 51: ***Efecto del ácido palmítico (PA) sobre la actividad del promotor de Pomc.*** Se incubaron células AtT-20 transfectadas con el plásmido *Pomc*-luc con PA 1 mM durante 24 h en presencia o ausencia de un inhibidor de autofagia (LY294002, 10 nM) o de un antioxidante (N-acetil cisteína, NAC, 100μM). La actividad de luciferasa normalizada con la de β-galactosidasa se indica como media ± SEM (n=5). Los datos fueron analizados por ANOVA seguido del test de Dunnet, $^{*}p<0.05$ *vs*. PA 0 mM.

Resultados similares se obtuvieron al evaluar los niveles de expresión del péptido POMC endógeno por *inmunoblot*. Como muestra la figura 52, la co-incubación de PA con un antioxidante (NAC, 100μM) o con un inhibidor de la autofagia (LY294002, 10nM) previnieron la disminución de los niveles de expresión de POMC generada por el tratamiento con PA 1mM, lo que sugiere que tanto el estrés oxidativo como la autofagia están involucrados en el efecto del PA sobre la regulación de los niveles de POMC.

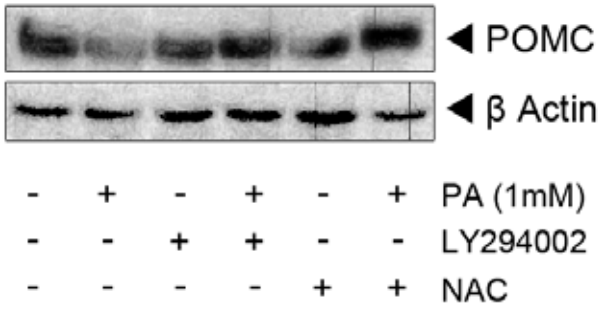
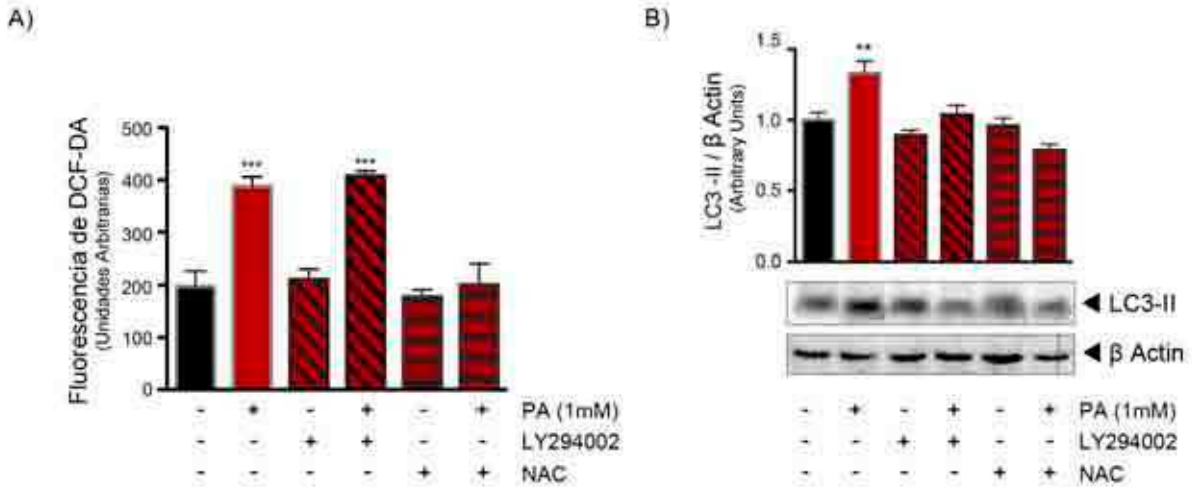


Figura 52: ***Efecto del tratamiento con ácido palmítico (PA, 24h) sobre la expresión de POMC, con o sin el agregado de inhibidor de autofagia (LY294002, 10nM) o antioxidante (N-acetil cisteína, NAC, 100µM).*** Se muestra el resultado de un *inmunoblot* representativo.

Por último, estudiamos la interacción entre la generación de estrés oxidativo y la inducción de autofagia en las células AtT-20 tratadas con PA 1mM. Con este fin, se realizaron co-incubaciones con NAC o con el inhibidor de autofagia LY294002 en presencia o ausencia de PA 1 mM, y se evaluó tanto la generación de especies reactivas del oxígeno (Figura 53 A), como la expresión de la isoforma II de la proteína LC-3, marcador del proceso de autofagia (Figura 53 B). Nuestros resultados indican que la inhibición de la autofagia con LY294002 no evitó la generación de EROs inducida por el tratamiento con PA 1mM (Figura 53 A). Por el contrario, tanto la inhibición de la autofagia con LY294002, como el tratamiento con el antioxidante (NAC) previnieron la inducción de autofagia, evaluada por el clivaje de LC3 inducido por la incubación con PA 1mM durante 24 horas (Figura 53 B).



<u>Figura 53</u>: Efecto del ácido palmítico sobre la generación de EROs (A) e inducción de autofagia (B) en células AtT-20 (PA 1mM, 24hs). Se incubaron las células con PA, con o sin el agregado de un inhibidor de autofagia (LY294002, 10nM) o un antioxidante (NAC, 100µM) y se analizó (A) la generación de EROs, medida por la fluorescencia del DCF-DA y (B) el procesamiento post-traduccional de LC-3, como marcador del proceso autofágico, evaluado por western blot. Los datos de la generación de EROs (A) y de la cuantificación densitométrica de los niveles de expresión de LC-3 II se muestran como media ± SEM (n=4), y fueron analizados por ANOVA, seguido del test post hoc de Dunnet.

En conjunto, los resultados obtenidos en la línea celular AtT-20 indican la participación de la autofagia y la generación de EROs en la disminución en los niveles de expresión de *Pomc*/ACTH y sugieren la participación del incremento en los niveles de AGNE en la inducción de estos procesos.

Discusión

Estudios realizados tanto en pacientes como en modelos animales han llevado a postular una asociación entre la presencia de alteraciones en la actividad del eje HHA y el síndrome metabólico o de resistencia a insulina (IR). Este síndrome y sus enfermedades metabólicas asociadas (como la obesidad y diabetes mellitus tipo 2, DMT2), presentan una elevada prevalencia a nivel mundial. Más aún, se estima que cerca del 10% de los adultos entre 20 y 79 años en Latinoamérica padecen DMT2, uno de los trastornos más frecuentemente asociados con la progresión de la IR [37], lo que representa un aspecto de gran relevancia en el marco de la Salud Pública [34]. Si bien la etiología de la IR es un tema aún controvertido y complejo, se ha demostrado el efecto de la dieta y en particular del consumo exacerbado de bebidas y comidas con alto contenido de azúcares simples en el desarrollo de IR y obesidad [100, 147, 148]. En este contexto, en el presente trabajo de Tesis se ha utilizado un modelo animal de IR generado por la administración de una dieta rica en carbohidratos simples (DRS, 30% p/v de sacarosa en el agua de bebida) [100] para analizar la actividad basal del eje HHA. En particular, se evaluó en el curso temporal del desarrollo de IR, la actividad endócrina corticotropa adenohipofisaria. Se estudiaron los efectos de la dieta en un estadio temprano del tratamiento, previo al establecimiento de la IR y en otro más tardío, donde los animales presentaron IR comprobada durante un período prolongado de tiempo. Establecidos los marcos temporales de estudio se evaluaron los efectos de una intervención farmacológica con moléculas antioxidantes sobre las alteraciones encontradas en las etapas

tempranas del tratamiento con DRS, y de la aplicación de un protocolo de ejercicio moderado sobre los efectos de la exposición prolongada a la dieta obesogénica. Se utilizó asimismo un modelo celular (línea celular corticotropa AtT-20) para profundizar los estudios sobre posibles mecanismos subyacentes a los cambios encontrados en el modelo animal.

A continuación, se discutirán los resultados obtenidos en este trabajo en función de los objetivos planteados.

Curso temporal de los efectos del consumo de DRS sobre el eje HHA

En concordancia con estudios previos de nuestro grupo determinamos que el consumo de una DRS durante 7 semanas generó una disminución en la insulinosensibilidad periférica, evaluada por un test de tolerancia a la insulina. En el estudio de Martínez Calejman *et al.* se observó que el desarrollo de IR se acompañó de cambios morfológicos y funcionales a nivel de la corteza adrenal, entre los que se destacaron una marcada deposición lipídica en la glándula, un incremento en los niveles séricos de GC y una disminución en la respuesta a ACTH exógena [100]. Dado que la hormona ACTH sintetizada en los corticotrofos de la adenohipófisis es la principal hormona reguladora de la esteroidogénesis adrenal, nos propusimos estudiar los efectos del consumo de DRS a nivel hipofisario en las diferentes etapas del desarrollo de IR inducida por esta dieta.

Comprobamos entonces que el consumo de la DRS generó en los animales una hiperglucemia moderada y un aumento significativo en los niveles de TAG y AGNE séricos que cursó con una hiperinsulinemia significativa en todas las semanas analizadas, y el establecimiento de IR (mediante la prueba ITT) a partir de la 7º semana de tratamiento. A su vez, se observó una diferencia significativa de peso corporal entre los grupos C y DRS a partir de la 5º semana de tratamiento.

El análisis de la bibliografía indicó resultados dispares para los parámetros mencionados, aún en la misma especie y con la administración de dietas similares [141]. Esto sugiere que otras variables, como las condiciones de los bioterios (temperatura, luz, humedad, etc.), la composición del alimento balanceado, el peso y

la edad iniciales de los animales entre otras, deberían estandarizarse con el fin de comparar los resultados obtenidos.

A nivel hipofisario observamos, durante el desarrollo de la IR, cambios en la expresión de *Pomc*, que se corresponden con los niveles circulantes de ACTH y corticosterona. En este sentido determinamos niveles significativamente mayores de estas hormonas, luego de 3 y 5 semanas de tratamiento mientras que, luego de 12 y 15 semanas se instauró una hipofunción del eje HHA, evidenciada por menores niveles hormonales.

El curso temporal de estos cambios puede enmarcarse en la teoría del *síndrome general de adaptación* enunciado por Hans Selye a mediados del siglo XX [2]. Como se expuso en la introducción, Selye propone 3 etapas en la respuesta frente a un estímulo estresor persistente. En las dos primeras, la *reacción de alarma* y la *fase de resistencia*, se observa un incremento en los niveles de GC circulantes, inicialmente mediado por la activación del sistema simpático (en la primera etapa), y sostenido por la hipertrofia de la *zona fasciculata* adrenal. En la tercera etapa, cuando la exposición al estímulo estresor persiste, el eje HHA podría entrar en la *fase de agotamiento* en la que su actividad disminuye. En este sentido, si bien inicialmente Cannon describió la activación del eje HHA como parte de la respuesta de *lucha o huida (fight or flight)* [1], posteriormente los trabajos de Selye la involucraron en la adaptación al estrés, independientemente de la naturaleza del estresor [2].

En nuestro sistema, la exposición a una dieta hipercalórica y obesogénica, como ha demostrado ser el consumo de DRS [100], podría constituir un estresor metabólico

persistente que genera, de esta forma, la hiperactivación del eje HHA, como observamos en etapas tempranas del tratamiento.

Esta respuesta, en el marco de la adaptación del organismo al nuevo contexto metabólico (hiperinsulinemia y mayores niveles de combustibles celulares circulantes) podría ser responsable de las alteraciones a largo plazo características del síndrome de IR. Resulta interesante destacar que en nuestro modelo, la hiperactivación del eje HHA es previa a la disminución de la sensibilidad a insulina, determinada en la 7º semana de tratamiento. Si bien esta no es una evidencia de causalidad entre estos dos fenómenos, la temporalidad de estos cambios respalda la participación de los GC en la patogénesis de la IR, como ha sido postulado en diversos estudios [100, 128, 138-140].

Los cambios observados en los niveles de ACTH/corticosterona circulantes en animales tratados con DRS durante períodos prolongados de tiempo (12 - 15 semanas) podrían asociarse con la última etapa descripta por Hans Selye, la *fase de agotamiento* [2]. Si bien la hipofunción del eje HHA, podría representar una ventaja adaptativa a nivel metabólico (la disminución de los niveles de GC circulantes atenuaría los efectos deletéreos asociados al hiperglucocorticoidismo), su agotamiento resulta una complicación adicional para los individuos con IR ya que afectaría su capacidad de responder ante nuevos estímulos estresantes. En este sentido, una producción insuficiente de GC alteraría la respuesta inflamatoria, el tono vasomotor y el equilibrio hidroelectrolítico, entre otros parámetros y requeriría de un tratamiento sustitutivo adecuado. De hecho, la insuficiencia suprarrenal se reconoce como una condición potencialmente letal que se presenta

en forma aguda (por ejemplo, como complicación de la sepsis meningocóccica o síndrome de Waterhouse-Friedrichsen), o crónica, en pacientes con enfermedad de Addison de etiología autoinmune o infecciosa (tuberculosis, infección por el virus HIV) [149].

A continuación, se discutirán los cambios observados en las diferentes etapas del tratamiento con DRS, y los posibles mecanismos subyacentes.

Efectos tempranos del consumo de DRS sobre la función adenohipofisaria

Como se expuso anteriormente, nuestros resultados mostraron que el consumo de DRS genera un aumento temprano de la actividad del eje HHA, evidenciado por mayores niveles de *Pomc*/ACTH hipofisarios y mayores niveles circulantes de ACTH y corticosterona. Como se indicó previamente, las variaciones en la actividad del eje HHA se acompañaron de cambios sistémicos en los animales (hiperglucemia, hipertrigliceridemia, aumento de AGNE e hiperinsulinemia), sin alteraciones significativas en la sensibilidad periférica a la insulina.

Con el fin de determinar posibles mecanismos involucrados en los cambios hormonales observados, analizamos los efectos de la administración de DRS durante 3 semanas a nivel del tejido adenohipofisario. Detectamos entonces daño oxidativo, activación de defensas antioxidantes, mayores niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias (como TNF-α) y un aumento en el número de células positivas para Iba-1 y F4-80 presentes en la glándula.

En forma análoga a lo demostrado en diversos tejidos obtenidos de animales alimentados con dietas hipercalóricas (hígado, hipotálamo y músculo cardíaco, entre otros) [150-152], nuestros resultados sugieren un aumento en la generación de estrés oxidativo (EOx) a nivel adenohipofisario. Con el fin de establecer si el desbalance redox observado se relaciona con las alteraciones en la función endócrina, y dado que la función de las células corticotropas adenohipofisarias puede afectarse por la generación de EOx [12], realizamos experimentos en los que tratamos a los animales con moléculas de reconocido poder antioxidante, como son el ácido α-lipoico y la melatonina [60, 70]. Observamos que el tratamiento con ácido

α-lipoico no previno el daño oxidativo a nivel hipofisario, así como tampoco evitó el aumento en la producción de *Pomc*/ACTH observado en este grupo de animales, posiblemente debido a un marcado efecto estimulatorio *per se* sobre los parámetros hormonales. El tratamiento con melatonina, en cambio, probó tener un efectivo poder antioxidante a nivel adenohipofisario y previno los cambios observados en la producción hormonal.

Las diferencias en la eficacia de ambos tratamientos en la prevención del daño oxidativo a nivel hipofisario podrían deberse a múltiples factores, como por ej. las diferentes vías de administración de las drogas o la dosis utilizada. Sin embargo, ambos tratamientos previnieron la inducción de sistemas antioxidantes, el aumento del número de macrófagos y la inducción de TNF-α, lo que confirma la acción de ambos tratamientos a nivel hipofisario.

En conjunto, los resultados con antioxidantes muestran una asociación entre la prevención de la generación de EOx y la normalización de la actividad del eje HHA en los animales tratados con DRS, lo que sugiere una fuerte correlación entre estos dos fenómenos.

El tratamiento con DRS durante 3 semanas indujo también un incremento en los niveles de ARNm de TNF-α y en el número de células positivas para los marcadores moleculares F4-80 e Iba1 en el tejido adenohipofisario. Estos marcadores se han utilizado ampliamente en la bibliografía para describir la presencia tisular de macrófagos y células derivadas de monocitos, respectivamente. La función de estas células en el tejido adenohipofisario es un tema poco estudiado. En este sentido, Wu *et al.* mostraron la presencia de macrófagos (F4-80 y Mac-2 positivos) en

adenohipófisis de ratas hembras, aunque la administración de una dieta rica en grasa durante 12 semanas no modificó este parámetro [153]. Esta diferencia con nuestros resultados podría ser consecuencia de diferencias entre las dietas, el tiempo de exposición a las mismas y el sexo de los animales, entre otros factores.

Los macrófagos son una población heterogénea de células de la inmunidad innata, constituyen el grupo de células funcionalmente más diverso del sistema hematopoyético, se encuentran en todos los tejidos y han sido involucrados tanto en procesos fisiológicos como patológicos. Su clasificación es un tema de debate vigente en la comunidad científica [154]. Tradicionalmente se los ha dividido en dos grupos: los macrófagos M1, clásicamente pro-inflamatorios, y los M2, clásicamente anti-inflamatorios aunque estas células pueden alterar su fenotipo y función transformándose en uno u otro subtipo mediante un proceso denominado *polarización*. Por otra parte, existen subgrupos con características intermedias entre ambos tipos de macrófagos y se reconoce que ambos tipos de macrófagos pueden coexistir en los tejidos. En general, los macrófagos de tipo M2 son considerados macrófagos residentes, que cumplen funciones homeostáticas en los tejidos [155]. En particular, se ha demostrado que la polarización hacia el subtipo de macrófagos inmunoregulatorios M2c puede ser inducida por GC, TGF-β e IL-10 [156].

Si bien detectamos un incremento en el número de macrófagos tisulares en los animales tratados con DRS, los resultados obtenidos hasta el momento no permiten establecer fehacientemente si estas células, o si las citoquinas producidas localmente participan en los efectos del consumo de DRS sobre la producción de ACTH o son simplemente epifenómenos generados por el mismo tratamiento. En ese

sentido, el aumento del número de macrófagos en el tejido adenohipofisario podría cumplir un rol homeostático, correspondiente a un fenotipo asociado a macrófagos tipo M2. Serán necesarios más estudios para evaluar la expresión de marcadores de macrófagos de los diferentes subtipos y poder caracterizar adecuadamente la población celular presente.

La falta de efecto del TNF-α sobre la actividad del plásmido reportero *Pomc*-luc en las células AtT-20 sugiere, en principio, que esta citoquina pro-inflamatoria no sería responsable del efecto observado *in vivo.* Estos resultados discrepan con los obtenidos por Katahira *et al.* quienes observaron un incremento, leve pero significativo, en la actividad del plásmido reportero de *Pomc* de rata en células AtT-20 incubadas en presencia de citoquinas (como IL-1β, IL-6, TNF-α e IFN-γ) [157]. Por otro lado, no pueden descartarse efectos de las citoquinas sobre el procesamiento y liberación de la hormona o que otras citoquinas, actuando de manera directa o indirecta sobre los corticotropos, modulen la función de la glándula.

El incremento de la glucemia es uno de los factores humorales que ha sido asociado con la generación de EOx en diferentes tejidos [158, 159]. Entre los mecanismos involucrados se encuentran su auto oxidación, la glicosilación no enzimática de proteínas, la generación de productos glicosilación avanzada, la sobreproducción de EROs por reducción parcial del O_2 a nivel mitocondrial (cadena de transporte de electrones) y la vía de los polioles [160]. Los experimentos realizados en la línea celular AtT-20 mostraron que la incubación de las células con niveles moderadamente elevados de D-glucosa induce la expresión de *Pomc*, a través de un

mecanismo que involucra la generación de EROs, ya que se previene por el tratamiento con antioxidantes. En este sentido, nuestros resultados están en concordancia con los descriptos por Asaba *et al*., en los que se observa que el tratamiento con D-glucosa 30mM induce la expresión de *Pomc*-luc en células AtT-20 [161]. No obstante, debe destacarse que la concentración de glucosa utilizada en nuestros estudios es más representativa de la hiperglucemia leve que se observa en los animales tratados con DRS durante 3 semanas, mientras que en los trabajos realizados por Asaba *et al.* se estudia el efecto de concentraciones de glucosa similares a las observadas en individuos con diabetes tipo 1 no compensada (30mM=540 mg/dl). Restan por estudiarse las vías involucradas en la generación de EOx a nivel hipofisario.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren la participación de la generación de EOx en la inducción de *Pomc*, aunque los mecanismos subyacentes no han sido aún establecidos. En este sentido, se ha sugerido que el desarrollo de EOx podría afectar la síntesis de *Pomc,* modulando diferentes vías de transducción de señales*.* En el trabajo mencionado anteriormente, Asaba *et al.* postularon la activación de factores de transcripción sensibles al EOx, como NFκB y AP-1 [161]. Por otra parte, se ha demostrado que la generación de EOx atenúa el *feedback* negativo que ejerce la activación del receptor de GC sobre la expresión de *Pomc*, exacerbando la respuesta a CRH en células AtT-20 [12].

Postulamos entonces que el consumo de DRS durante 3 semanas, genera EOx a nivel hipofisario debido, entre otros factores, al aumento de la glucemia, lo que lleva a la desregulación de la producción de *Pomc*/ACTH. Respecto del mecanismo

involucrado, no podemos descartar ninguna de las posibilidades que surgen de los trabajos mencionados anteriormente.

Dados los efectos deletéreos asociados con la hiperactivación del eje HHA, su prevención por el co-tratamiento con melatonina, le asigna un potencial terapéutico adicional hasta ahora inexplorado a este potente fármaco.

En forma concordante, Konakchieva *et al.* demostraron que, luego de 7 días de administración de melatonina (80mg/kg, i.p. cada 24h), los animales muestran una disminución significativa en la respuesta adrenocortical al estrés agudo y crónico, y en el contenido hipotalámico de CRH, sin modificaciones en los niveles de AVP hipotalámicos [162]. A su vez, en la línea celular AtT-20, el tratamiento con melatonina, por un efecto mediado por el receptor MT1, suprimió la producción de ACTH mediante la activación de la vía de BMP-4 [163]. Sugerimos entonces que la melatonina podría afectar la función endócrina de la hipófisis actuando como antioxidante, según lo indican los resultados de nuestro trabajo, y/o por efectos vía receptor.

El tratamiento con melatonina también ha demostrado tener efectos insulinosensibilizadores. En el estudio de Kitagawa *et al.*, la melatonina mejoró la insulinosensibilidad de animales alimentados con una dieta rica en fructosa durante 6 semanas [164] mientras que Sartori *et al.* demostraron que la melatonina mejoró el índice HOMA-IR en ratones alimentados con dietas ricas en grasa (HFD) durante 10 semanas [165]. Resta por comprobar si, en nuestro modelo de IR, el tratamiento con melatonina previene el desarrollo de IR y en ese caso, si esa prevención se relaciona con la eficiencia del tratamiento antioxidante de evitar las alteraciones

observadas del eje HHA a nivel hipofisario, aún sin modificar los parámetros humorales estudiados.

En suma, los resultados de esta sección, junto con los de los estudios mencionados, sugieren que la melatonina podría tener un uso terapéutico en la población de pacientes con alteraciones metabólicas, presenten o no cambios significativos en su sensibilidad a insulina. Sus efectos benéficos podrían incluir la prevención de alteraciones en el eje HHA (que contribuirían al desarrollo de IR), y, la corrección en la sensibilidad a insulina en pacientes con síndrome metabólico instaurado.

Efecto del consumo prolongado de DRS sobre la actividad del eje HHA

En la primera parte de este trabajo demostramos un aumento de los niveles de corticosterona sérica luego de 3 y 5 semanas de tratamiento con DRS. Diversas evidencias experimentales indican que el incremento en la producción o en la activación local de los GC puede contribuir a agravar los desórdenes metabólicos y somáticos que caracterizan al síndrome de IR [166-168]. Sin embargo, hasta el momento se desconocía si, en el modelo de IR por administración de DRS, el incremento en los niveles séricos de GC observado en las primeras semanas del tratamiento se sostenía en el tiempo. En este sentido, nuestros resultados indicaron que el consumo prolongado de DRS lleva paulatinamente a una disminución significativa de la producción y liberación de ACTH y corticosterona, que es mediada, al menos en parte, por efectos a nivel adenohipofisario. Esto podría representar una posible ventaja adaptativa, ya que la disminución de los niveles de GC circulantes podría aliviar el estrés metabólico y los efectos deletéreos asociados con el hiperglucocorticoidismo.

Los estudios realizados mostraron un descenso en la expresión del ARNm de *Pomc* y de la producción de ACTH a nivel hipofisario, asociados con menores niveles de corticosterona séricos, luego de 15 semanas de tratamiento con DRS. El análisis de posibles mecanismos involucrados nos lleva a proponer que la hipofunción adenohipofisaria podría estar relacionada con la generación de EROs sostenida en el tiempo (ya evidente desde la semana 3), el estrés de RE y la inducción de autofagia. El ejercicio moderado previno los cambios en los parámetros de autofagia y de defensa antioxidante observados en los animales tratados con DRS, así como

también la disminución en la síntesis y secreción de ACTH y, por ello, hipotetizamos que estos procesos podrían estar asociados a la disfunción hipofisaria observada en los animales tratados con DRS durante 15 semanas.

Hasta el presente se han publicado diversos estudios que analizan el efecto del consumo de dietas obesogénicas sobre la actividad basal del eje HHA [169-171]. Sin embargo, el análisis exhaustivo de la bibliografía indica una gran disparidad en los resultados presentados, lo que ha sido atribuido, entre otros factores, a las características de los protocolos experimentales o a los diferentes modelos animales o dietas utilizadas [141]. En este sentido, nuestros resultados se alinean con estudios realizados en ratones y en cerdos, donde se determinaron menores niveles de glucocorticoides luego de varias semanas de tratamiento con dietas ricas en grasas [169, 172].

Diversos estudios describen la generación de EOx inducida por el consumo de dietas hipercalóricas, en diferentes tejidos de animales con IR [173-176]. Un incremento en la disponibilidad de nutrientes puede resultar en una producción exacerbada de EROs, generando especies parcialmente reducidas derivadas del O_2, principalmente a nivel de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En forma adicional, también pueden producirse EROs en la membrana plasmática, los peroxisomas, el citosol y el RE [177]. Nuestros resultados muestran la inducción de enzimas antioxidantes en las adenohipófisis de animales del grupo DRS, lo que podría ser consecuencia de la generación crónica de EROs en este tejido. Una citoprotección insuficiente ejercida por los sistemas de defensa antioxidante, podría ocasionar, entre otros efectos, disfunción mitocondrial, pérdida de la integridad del ADN, mal

plegamiento de proteínas y generación de estrés del RE [177]. En este sentido, el estrés del RE ha sido asociado con la obesidad y el desarrollo de IR [178, 179]. En particular, se ha descrito la inducción de estrés de RE en tejido adiposo y hepático de ratas tratadas con dietas ricas en fructosa [180, 181].

La respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE involucra un aumento de la capacidad de plegamiento proteico en el RE y una disminución en la síntesis de proteínas, mediante la inhibición general de la traducción. Estos mecanismos llevan al restablecimiento de la homeostasis, favoreciendo la degradación vía proteosoma de las proteínas mal plegadas acumuladas. La generación de estrés del RE también ha sido asociada con la inducción del flujo autofágico [85, 86, 178]. En este sentido, la autofagia es considerada como un mecanismo protector que, dependiendo del contexto, contrarresta los efectos del estrés del RE, promoviendo mecanismos de supervivencia o de muerte celular. A modo de ejemplo, se ha demostrado que la inducción farmacológica del proceso autofágico en animales con IR inducida por dieta ha reducido el estrés del RE y la apoptosis de las células β pancreáticas [88]. Nuestros resultados indicaron la inducción de estrés del RE y de autofagia en las adenohipófisis de animales tratados con DRS durante 15 semanas, lo que nos llevó a postular una relación entre estos procesos y la inhibición de la producción de *Pomc* y ACTH en estos animales.

El ejercicio físico es una terapia ampliamente recomendada a pacientes obesos y diabéticos por sus reconocidos efectos benéficos sobre la sensibilidad a insulina [106]. En ratas alimentadas con DRS, el ejercicio mejora este parámetro aumentando la captación de glucosa en el tejido muscular [110]. Respecto de la

actividad basal del eje HHA, se ha demostrado que el ejercicio ejerce efectos normalizadores, principalmente a nivel de la corteza adrenal, en el modelo animal de diabetes tipo 2 en ratas Zucker [182]. En nuestro diseño experimental, el ejercicio no previno la disminución de la sensibilidad a insulina inducida por el consumo de DRS durante 15 semanas, según sugieren los resultados del test de tolerancia a la insulina. Esta falta de efecto del ejercicio sobre la sensibilidad a insulina podría deberse a que la intensidad del protocolo de ejercicio moderado implementado en nuestros estudios fue mucho menor a aquellas descriptas en la bibliografía, una característica establecida con la intención de prevenir estímulos estresantes externos y así minimizar alteraciones en la actividad del eje HHA. Sin embargo, el protocolo de ejercicio evitó el descenso en los niveles de expresión de *Pomc*, ACTH plasmática y corticosterona sérica observado en los animales que consumieron DRS durante 15 semanas, lo que sugiere que al menos en nuestro período de estudio, el ejercicio moderado previene la disfunción hipofisaria por un mecanismo que no afecta el desarrollo de la IR sistémica. Es interesante notar que la disfunción endócrina observada, no se debe a una disminución en el número de células ACTH-positivas a nivel hipofisario, ya que la inmunomarcación para ACTH en cortes de hipófisis no varió en ninguno de nuestros grupos experimentales.

Dado que el ejercicio, a su vez, bloqueó la inducción de autofagia y de los sistemas antioxidantes, sin afectar la generación de estrés del RE, sugerimos que la generación de EROs, la inducción de autofagia o ambos procesos podrían estar involucrados en los efectos inhibitorios del consumo de DRS que observamos sobre la función hipofisaria.

Dada la complejidad inherente a los modelos animales, evaluamos esta hipótesis en células corticotropas de la línea AtT-20 en cultivo. Demostramos entonces que inductores farmacológicos de EOx y de autofagia, como el peróxido de hidrógeno y la rapamicina, respectivamente, disminuyeron la actividad del plásmido reportero del promotor de *Pomc*, lo que sugiere que estos procesos podrían estar involucrados en la regulación de la expresión de este gen.

En diversos estudios se ha asociado la generación de IR en músculo y en tejido adiposo con niveles suprafisiológicos de ácidos grasos no esterificados en sangre (AGNE), a través de la producción de DAG, ceramidas y EOx [183, 184]. En nuestras condiciones experimentales encontramos que el tratamiento con DRS aumentó significativamente los niveles de AGNE, y que el ejercicio moderado evitó este aumento, sin modificar el peso corporal, los niveles de glucosa y triglicéridos circulantes o la insulinosensibilidad de los animales. Respecto de la composición de la fracción de AGNE plasmática, diversos estudios indican una preponderancia de la fracción de ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico (PA), cuyos niveles se encuentran aumentados en ratas *Wistar* macho tratadas con DRS durante 16 semanas [185]. A su vez, se ha demostrado que la infusión aguda con PA, o con *intralipid* (una solución de aceite de soja purificado), disminuye los niveles basales de ACTH y de GC en ratas *Wistar* y en humanos, respectivamente [186, 187].

En conjunto, estas evidencias nos llevaron a postular que un incremento en los niveles sanguíneos de PA podría generar los efectos sobre la expresión de *Pomc*/ACTH observados en las ratas tratadas con DRS mediante la inducción de EOx y/o autofagia a nivel hipofisario. Esta hipótesis se sustenta en el hecho de que el

tratamiento con PA disminuyó significativamente la expresión de *Pomc,* mientras que aumentó la generación de EROs y la expresión de marcadores de autofagia en los corticotropos de la línea AtT-20. A su vez, la inhibición farmacológica de cada uno de estos procesos bloqueó los efectos del PA sobre este la transcripción de *Pomc*. Adicionalmente, la inhibición de la autofagia no previno la inducción de EOx, mientras que, por el contrario, el tratamiento con antioxidantes bloqueó la inducción de autofagia, lo que sugiere una secuencia de eventos en la que el tratamiento con PA induce la generación de EROs, que a su vez induce el flujo autofágico. En este sentido, se ha demostrado la inducción de autofagia por EOx en músculo esquelético de ratas Goto-Kakizaki [188].

La disminución en los niveles de ARNm de *Pomc* en las hipófisis de animales tratados con DRS durante 15 semanas podría deberse a una menor transcripción del gen (por ejemplo, mediante factores que afectan la tasa basal de transcripción, o por el *feedback* negativo de los GC), como la que observamos en células AtT-20 tratadas con PA, o a una menor estabilidad del ARNm. Los resultados obtenidos no permiten descartar cambios en la estabilidad del ARNm de *Pomc* u otros efectos sobre el procesamiento de POMC por convertasas específicas (tal como fue reportado en hipotálamos de ratas tratadas con dietas ricas en grasa [189]).

En resumen, nuestros resultados demuestran que el consumo de DRS genera una disminución de la actividad basal de la glándula hipofisaria, con una menor expresión de *Pomc*/ACTH y niveles circulantes de ACTH y corticosterona, luego de 15 semanas de tratamiento. La intervención con un protocolo de ejercicio moderado, aplicado desde el comienzo de la modificación dietaria, previno la

disfunción hipofisaria y también la generación de EROs y autofagia inducida por el aumento en la disponibilidad de nutrientes circulantes. Nuestros estudios *in vitro* demuestran que el tratamiento con PA puede reproducir la inhibición de la transcripción de *Pomc* mediante un mecanismo que involucra la inducción de autofagia mediada por la generación de EOx.

Perspectivas a futuro

Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis doctoral permitieron revelar algunos de los mecanismos potencialmente involucrados en las alteraciones generadas, por el consumo de dietas hipercalóricas, sobre la actividad del eje HHA. Asimismo, este trabajo abre posibilidades de estudio no previstas al inicio del mismo, que motivarán, seguramente, el surgimiento de nuevos debates, discusiones y experimentos en nuestro grupo de trabajo.

Entre ellos, se propone para el futuro estudiar el rol de la hiperactivación del eje HHA en la génesis de la IR inducida por el consumo de DRS. Para esto, resultará de interés, por ejemplo, analizar el efecto de la DRS sobre parámetros de IR en ratas adrenalectomizadas e implantadas con *pellets* subcutáneos de corticosterona que mantengan los niveles de GC constantes y basales durante todo el tratamiento.

Por otro lado, los resultados obtenidos luego de 15 semanas de tratamiento con DRS sugieren una menor actividad hipofisaria y, consecuentemente, de la corteza suprarrenal de estos animales. La insuficiencia adrenal podría afectar la respuesta del organismo frente a situaciones de estrés, lo que redundaría en un riesgo adicional para la calidad de vida de pacientes con IR, que debería tenerse en cuenta como un aspecto de cuidado terapéutico. En particular, postulamos que esta condición podría incidir negativamente en la evolución y sobrevida de los animales en modelos aceptados de estrés con consecuencias graves para las funciones vitales. En este sentido, se planean experimentos para elucidar el efecto de la insuficiencia

adrenal inducida por el consumo prolongado de DRS en la sobrevida de animales sometidos a distintos tipos de estrés.

Bibliografía

1. Cannon, W.B., *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage*. 1920, United States of America: D Appleton and Company.
2. Selye, H., *The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation.* Practitioner, 1949. **163**(977): p. 393-405.
3. Norris D, C.J., *Vertebrate Endocrinology*. 5th Edition ed. 2013: Elsevier Inc.
4. Heaney, A.P. and S. Melmed, *Molecular targets in pituitary tumours.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(4): p. 285-95.
5. Howe, A., *The mammalian pars intermedia: a review of its structure and function.* J Endocrinol, 1973. **59**(2): p. 385-409.
6. Vale, W., et al., *Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin.* Science, 1981. **213**(4514): p. 1394-7.
7. Rivier, C. and W. Vale, *Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin.* Nature, 1983. **305**(5932): p. 325-7.
8. Lamberts, S.W., et al., *Corticotropin-releasing factor (ovine) and vasopressin exert a synergistic effect on adrenocorticotropin release in man.* J Clin Endocrinol Metab, 1984. **58**(2): p. 298-303.
9. Bonfiglio, J.J., et al., *The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved.* Neuroendocrinology, 2011. **94**(1): p. 12-20.
10. Kovalovsky, D., et al., *Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways.* Mol Endocrinol, 2002. **16**(7): p. 1638-51.
11. Jenks, B.G., *Regulation of proopiomelanocortin gene expression: an overview of the signaling cascades, transcription factors, and responsive elements involved.* Ann N Y Acad Sci, 2009. **1163**: p. 17-30.

12. Asaba, K., et al., *Attenuation by reactive oxygen species of glucocorticoid suppression on proopiomelanocortin gene expression in pituitary corticotroph cells.* Endocrinology, 2004. **145**(1): p. 39-42.
13. Jackson, D.S., et al., *Melanocortin receptor accessory proteins in adrenal disease and obesity.* Front Neurosci, 2015. **9**: p. 213.
14. Fan, J. and V. Papadopoulos, *Evolutionary origin of the mitochondrial cholesterol transport machinery reveals a universal mechanism of steroid hormone biosynthesis in animals.* PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76701.
15. Stocco, D.M., *StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis.* Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 193-213.
16. Pomeraniec, Y., et al., *Adrenocorticotropin induces heme oxygenase-1 expression in adrenal cells.* J Endocrinol, 2004. **180**(1): p. 113-24.
17. 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.
18. Sanchez, R., et al., *Crosstalk between nitric oxide synthases and cyclooxygenase 2 in the adrenal cortex of rats under lipopolysaccharide treatment.* Endocrine, 2014. **46**(3): p. 659-67.
19. Presman, D.M., et al., *Live cell imaging unveils multiple domain requirements for in vivo dimerization of the glucocorticoid receptor.* PLoS Biol, 2014. **12**(3): p. e1001813.
20. Tasker, J.G., S. Di, and R. Malcher-Lopes, *Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors.* Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5549-56.
21. Wang, M., *The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome.* Nutr Metab (Lond), 2005. **2**(1): p. 3.
22. Masuzaki, H., et al., *A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome.* Science, 2001. **294**(5549): p. 2166-70.
23. *Glucocorticoid Signaling: From Molecules to Mice to Man*. Advances in Experimental Medicine and Biology, ed. C.H. Jen-Chywan Wang. 2015: Springer New York Heidelberg Dordrecht London.

24. Mukaida, N., et al., *Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression.* J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13289-95.
25. Waage, A., G. Slupphaug, and R. Shalaby, *Glucocorticoids inhibit the production of IL6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts.* Eur J Immunol, 1990. **20**(11): p. 2439-43.
26. Zilberfarb, V., et al., *Effect of dexamethasone on adipocyte differentiation markers and tumour necrosis factor-alpha expression in human PAZ6 cells.* Diabetologia, 2001. **44**(3): p. 377-86.
27. Besedovsky, H., et al., *Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones.* Science, 1986. **233**(4764): p. 652-4.
28. Dunn, A.J., *Cytokine activation of the HPA axis.* Ann N Y Acad Sci, 2000. **917**: p. 608-17.
29. Fu, Z., E.R. Gilbert, and D. Liu, *Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes.* Curr Diabetes Rev, 2013. **9**(1): p. 25-53.
30. Notkins, A.L., *Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes.* J Biol Chem, 2002. **277**(46): p. 43545-8.
31. Belfiore, A., et al., *Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease.* Endocr Rev, 2009. **30**(6): p. 586-623.
32. Cheung, B.M. and C. Li, *Diabetes and hypertension: is there a common metabolic pathway?* Curr Atheroscler Rep, 2012. **14**(2): p. 160-6.
33. (ALAD), A.L.d.D., *Guías ALAD sobre el diagnóstico, control y tratamiento de la DMT2 con Medicina basada en evidencia*, ed. ALAD. 2013.
34. (IDF), I.D.F., *The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome*, ed. I.D. Federation. 2006.
35. Friedman, J.M., *Obesity in the new millennium.* Nature, 2000. **404**(6778): p. 632-4.
36. 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.

37. ALAD, *Consenso latinoamericano de la Asociación Latinoamericana de Diabetes*. 2011.
38. Karpe, F., J.R. Dickmann, and K.N. Frayn, *Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation.* Diabetes, 2011. **60**(10): p. 2441-9.
39. 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.
40. Samuel, V.T. and G.I. Shulman, *Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links.* Cell, 2012. **148**(5): p. 852-71.
41. 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.
42. Fantuzzi, G., *Adipose tissue, adipokines, and inflammation.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(5): p. 911-9; quiz 920.
43. 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.
44. Fridlyand, L.E. and L.H. Philipson, *Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes.* Diabetes Obes Metab, 2006. **8**(2): p. 136-45.
45. Furukawa, S., et al., *Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome.* J Clin Invest, 2004. **114**(12): p. 1752-61.
46. Haber, C.A., et al., *N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(4): p. E744-53.
47. Houstis, N., E.D. Rosen, and E.S. Lander, *Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance.* Nature, 2006. **440**(7086): p. 944-8.
48. Jacob, S., et al., *Oral administration of RAC-alpha-lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial.* Free Radic Biol Med, 1999. **27**(3-4): p. 309-14.
49. Khamaisi, M., et al., *Lipoic acid reduces glycemia and increases muscle GLUT4 content in streptozotocin-diabetic rats.* Metabolism, 1997. **46**(7): p. 763-8.

50. Konrad, T., et al., *alpha-Lipoic acid treatment decreases serum lactate and pyruvate concentrations and improves glucose effectiveness in lean and obese patients with type 2 diabetes.* Diabetes Care, 1999. **22**(2): p. 280-7.
51. Maddux, B.A., et al., *Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by mircomolar concentrations of alpha-lipoic acid.* Diabetes, 2001. **50**(2): p. 404-10.
52. Tangvarasittichai, S., *Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus.* World J Diabetes, 2015. **6**(3): p. 456-80.
53. Inoguchi, T., et al., *High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells.* Diabetes, 2000. **49**(11): p. 1939-45.
54. Szendroedi, J., et al., *Role of diacylglycerol activation of PKCtheta in lipid-induced muscle insulin resistance in humans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(26): p. 9597-602.
55. Qatanani, M. and M.A. Lazar, *Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu.* Genes Dev, 2007. **21**(12): p. 1443-55.
56. 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.
57. Cohen, P., *The twentieth century struggle to decipher insulin signalling.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(11): p. 867-73.
58. Sung, C.C., et al., *Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease.* Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 301982.
59. Hata, I., et al., *Involvement of thioredoxin in the regulation of growth hormone secretion in rat pituitary cell cultures.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **281**(2): p. E269-74.
60. Johansen, J.S., et al., *Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice.* Cardiovasc Diabetol, 2005. **4**: p. 5.

61. Kim, Y.M., et al., *Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities.* Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(1): p. 137-67.

62. Wu, L. and R. Wang, *Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications.* Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 585-630.

63. Packer, L., K. Kraemer, and G. Rimbach, *Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications.* Nutrition, 2001. **17**(10): p. 888-95.

64. Shay, K.P., et al., *Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(10): p. 1149-60.

65. Zhang, W.J., et al., *Alpha-lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 4077-82.

66. Lee, W.J., et al., *Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(3): p. 885-91.

67. Cummings, B.P., et al., *Dietary fructose accelerates the development of diabetes in UCD-T2DM rats: amelioration by the antioxidant, alpha-lipoic acid.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **298**(5): p. R1343-50.

68. Sola, S., et al., *Irbesartan and lipoic acid improve endothelial function and reduce markers of inflammation in the metabolic syndrome: results of the Irbesartan and Lipoic Acid in Endothelial Dysfunction (ISLAND) study.* Circulation, 2005. **111**(3): p. 343-8.

69. Hardeland, R., S.R. Pandi-Perumal, and D.P. Cardinali, *Melatonin.* Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(3): p. 313-6.

70. Hardeland, R. and S.R. Pandi-Perumal, *Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug.* Nutr Metab (Lond), 2005. **2**: p. 22.

71. Hotamisligil, G.S., et al., *Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance.* J Clin Invest, 1995. **95**(5): p. 2409-15.
72. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
73. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes.* J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1111-9.
74. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
75. Kanda, H., et al., *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity.* The Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(6): p. 1494-1505.
76. Weisberg, S.P., et al., *CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding.* J Clin Invest, 2006. **116**(1): p. 115-24.
77. 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.
78. Kosteli, A., et al., *Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue.* J Clin Invest, 2010. **120**(10): p. 3466-79.
79. Hotamisligil, G.S., *Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis.* Nat Med, 2010. **16**(4): p. 396-9.
80. Lee, A.H., et al., *Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1.* Science, 2008. **320**(5882): p. 1492-6.
81. Boden, G., et al., *Insulin regulates the unfolded protein response in human adipose tissue.* Diabetes, 2014. **63**(3): p. 912-22.
82. Amaya, C., C.M. Fader, and M.I. Colombo, *Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking.* FEBS Lett, 2015.
83. Bjorkoy, G., et al., *Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1.* Methods Enzymol, 2009. **452**: p. 181-97.
84. Tyedmers, J., A. Mogk, and B. Bukau, *Cellular strategies for controlling protein aggregation.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(11): p. 777-88.

85. Hoyer-Hansen, M. and M. Jaattela, *Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium.* Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1576-82.

86. Qiu, W., et al., *Hepatic autophagy mediates endoplasmic reticulum stress-induced degradation of misfolded apolipoprotein B.* Hepatology, 2011. **53**(5): p. 1515-25.

87. Yorimitsu, T., et al., *Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy.* J Biol Chem, 2006. **281**(40): p. 30299-304.

88. Bachar-Wikstrom, E., et al., *Stimulation of autophagy improves endoplasmic reticulum stress-induced diabetes.* Diabetes, 2013. **62**(4): p. 1227-37.

89. De Stefanis, D., et al., *Effects of chronic sugar consumption on lipid accumulation and autophagy in the skeletal muscle.* Eur J Nutr, 2015.

90. Weckman, A., et al., *Autophagy in the endocrine glands.* J Mol Endocrinol, 2014. **52**(2): p. R151-63.

91. Doggrell, S.A. and L. Brown, *Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure.* Cardiovasc Res, 1998. **39**(1): p. 89-105.

92. Speakman, J., et al., *Animal models of obesity.* Obes Rev, 2007. **8 Suppl 1**: p. 55-61.

93. King, A.J., *The use of animal models in diabetes research.* Br J Pharmacol, 2012. **166**(3): p. 877-94.

94. Massiera, F., et al., *A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations.* J Lipid Res, 2010. **51**(8): p. 2352-61.

95. 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.

96. 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.

97. 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, 2010. **299**(5): p. E685-94.

98. 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, 2011. **105**(8): p. 1188-98.

99. Huang, W., et al., *Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance.* Diabetes, 2010. **59**(2): p. 347-57.

100. Martinez Calejman, C., et al., *Insulin sensitization with a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist prevents adrenocortical lipid infiltration and secretory changes induced by a high-sucrose diet.* J Endocrinol, 2012. **214**(3): p. 267-76.

101. Kanat, M., R.A. DeFronzo, and M.A. Abdul-Ghani, *Treatment of prediabetes.* World J Diabetes, 2015. **6**(12): p. 1207-22.

102. Lim, E.L., et al., *Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol.* Diabetologia, 2011. **54**(10): p. 2506-14.

103. Muscelli, E., et al., *Differential effect of weight loss on insulin resistance in surgically treated obese patients.* Am J Med, 2005. **118**(1): p. 51-7.

104. Tiikkainen, M., et al., *Effects of equal weight loss with orlistat and placebo on body fat and serum fatty acid composition and insulin resistance in obese women.* Am J Clin Nutr, 2004. **79**(1): p. 22-30.

105. Kitabchi, A.E., et al., *Role of insulin secretion and sensitivity in the evolution of type 2 diabetes in the diabetes prevention program: effects of lifestyle intervention and metformin.* Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2404-14.

106. Campbell, H.M., et al., *Relationship between diet, exercise habits, and health status among patients with diabetes.* Res Social Adm Pharm, 2011. **7**(2): p. 151-61.

107. 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.

108. Wojtaszewski, J.F., et al., *Insulin signalling: effects of prior exercise.* Acta Physiol Scand, 2003. **178**(4): p. 321-8.

109. 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.

110. 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.

111. Hansen, P.A., et al., *Increased GLUT-4 translocation mediates enhanced insulin sensitivity of muscle glucose transport after exercise.* J Appl Physiol (1985), 1998. **85**(4): p. 1218-22.

112. 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.

113. Scomparin, D.X., et al., *Low-Intensity swimming training after weaning improves glucose and lipid homeostasis in MSG hypothalamic obese mice.* Endocr Res, 2011. **36**(2): p. 83-90.

114. Passos, E., et al., *Endoplasmic Reticulum Stress Response in Non-alcoholic Steatohepatitis: The Possible Role of Physical Exercise.* Metabolism, 2015. **64**(7): p. 780-92.

115. da Luz, G., et al., *Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats.* Eur J Appl Physiol, 2011. **111**(9): p. 2015-23.

116. Kawanishi, N., et al., *Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced-obesity in mice.* Brain Behav Immun, 2012. **26**(6): p. 931-41.

117. Kizaki, T., et al., *Voluntary exercise attenuates obesity-associated inflammation through ghrelin expressed in macrophages.* Biochem Biophys Res Commun, 2011. **413**(3): p. 454-9.

118. Oliveira, A.G., et al., *Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats.* Diabetes, 2011. **60**(3): p. 784-96.

119. Teixeira de Lemos, E., et al., *Exercise training decreases proinflammatory profile in Zucker diabetic (type 2) fatty rats.* Nutrition, 2009. **25**(3): p. 330-9.

120. Ascensao, A., R. Ferreira, and J. Magalhaes, *Exercise-induced cardioprotection--biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria.* Int J Cardiol, 2007. **117**(1): p. 16-30.

121. Ascensao, A., et al., *Modulation of hepatic redox status and mitochondrial metabolism by exercise: therapeutic strategy for liver diseases.* Mitochondrion, 2013. **13**(6): p. 862-70.

122. Asghar, M., L. George, and M.F. Lokhandwala, *Exercise decreases oxidative stress and inflammation and restores renal dopamine D1 receptor function in old rats.* Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **293**(3): p. F914-9.

123. Gounder, S.S., et al., *Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training.* PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45697.

124. Kim, Y., et al., *Three weeks voluntary running wheel exercise increases endoplasmic reticulum stress in the brain of mice.* Brain Res, 2010. **1317**: p. 13-23.

125. Yang, L., et al., *Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance.* Cell Metab, 2010. **11**(6): p. 467-78.

126. He, C., et al., *Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis.* Nature, 2012. **481**(7382): p. 511-5.

127. Cushing, H., *The basophil adenomas of the pituitary body.* Ann R Coll Surg Engl, 1969. **44**(4): p. 180-1.

128. Pivonello, R., et al., *Pathophysiology of diabetes mellitus in Cushing's syndrome.* Neuroendocrinology, 2010. **92 Suppl 1**: p. 77-81.

129. Vander Kooi, B.T., et al., *The glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter contains both positive and negative glucocorticoid response elements.* Mol Endocrinol, 2005. **19**(12): p. 3001-22.

130. Kraus-Friedmann, N., *Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis.* Physiol Rev, 1984. **64**(1): p. 170-259.

131. Dirlewanger, M., et al., *Effects of glucocorticoids on hepatic sensitivity to insulin and glucagon in man.* Clin Nutr, 2000. **19**(1): p. 29-34.

132. 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.

133. Ruzzin, J., A.S. Wagman, and J. Jensen, *Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor.* Diabetologia, 2005. **48**(10): p. 2119-30.

134. Seckl, J.R., et al., *Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue.* Recent Prog Horm Res, 2004. **59**: p. 359-93.

135. 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.

136. 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.

137. Plotsky, P.M., et al., *Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the Zucker obese rat.* Endocrinology, 1992. **130**(4): p. 1931-41.

138. 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.

139. 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.

140. 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.

141. Auvinen, H.E., et al., *Effects of high fat diet on the Basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice: a systematic review.* Horm Metab Res, 2011. **43**(13): p. 899-906.

142. Guarino, M.P., et al., *Effects of anaesthesia on insulin sensitivity and metabolic parameters in Wistar rats.* In Vivo, 2013. **27**(1): p. 127-32.

143. Bonora, E., et al., *Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies.* J Clin Endocrinol Metab, 1989. **68**(2): p. 374-8.

144. Mercau, M.E., et al., *Involvement of PI3K/Akt and p38 MAPK in the induction of COX-2 expression by bacterial lipopolysaccharide in murine adrenocortical cells.* Mol Cell Endocrinol, 2014. **384**(1-2): p. 43-51.

145. Jung, C.H., et al., *mTOR regulation of autophagy.* FEBS Lett, 2010. **584**(7): p. 1287-95.

146. Renna, M., et al., *Chemical inducers of autophagy that enhance the clearance of mutant proteins in neurodegenerative diseases.* J Biol Chem, 2010. **285**(15): p. 11061-7.

147. Collino, M., *High dietary fructose intake: Sweet or bitter life?* World J Diabetes, 2011. **2**(6): p. 77-81.

148. Gulati, S. and A. Misra, *Sugar intake, obesity, and diabetes in India.* Nutrients, 2014. **6**(12): p. 5955-74.

149. Neary, N. and L. Nieman, *Adrenal insufficiency: etiology, diagnosis and treatment.* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2010. **17**(3): p. 217-23.

150. Gamez-Mendez, A.M., et al., *Oxidative Stress-Dependent Coronary Endothelial Dysfunction in Obese Mice.* PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0138609.

151. Kang, D.H., et al., *High-fat diet-induced obesity exacerbates kainic acid-induced hippocampal cell death.* BMC Neurosci, 2015. **16**(1): p. 72.

152. Nakano, S., et al., *Remogliflozin Etabonate Improves Fatty Liver Disease in Diet-Induced Obese Male Mice.* J Clin Exp Hepatol, 2015. **5**(3): p. 190-8.

153. Wu, S., et al., *Reproductive tissues maintain insulin sensitivity in diet-induced obesity.* Diabetes, 2012. **61**(1): p. 114-23.

154. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment.* F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 13.

155. Davies, L.C., et al., *Tissue-resident macrophages.* Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 986-95.

156. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization.* Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.

157. Katahira, M., et al., *Cytokine regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT-20 cells.* Endocrinology, 1998. **139**(5): p. 2414-22.

158. Astort, F., et al., *High glucose-induced changes in steroid production in adrenal cells.* Diabetes Metab Res Rev, 2009. **25**(5): p. 477-86.

159. Mooradian, A.D., L. Onstead-Haas, and M.J. Haas, *Asymmetrical cross-talk between the endoplasmic reticulum stress and oxidative stress caused by dextrose.* Life Sci, 2015.

160. Chung, S.S., et al., *Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress.* J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8 Suppl 3): p. S233-6.

161. Asaba, K., et al., *High glucose activates pituitary proopiomelanocortin gene expression: possible role of free radical-sensitive transcription factors.* Diabetes Metab Res Rev, 2007. **23**(4): p. 317-23.

162. Konakchieva, R., et al., *Chronic melatonin treatment and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat: attenuation of the secretory response to stress and effects on hypothalamic neuropeptide content and release.* Biol Cell, 1997. **89**(9): p. 587-96.

163. Tsukamoto, N., et al., *Melatonin receptor activation suppresses adrenocorticotropin production via BMP-4 action by pituitary AtT20 cells.* Mol Cell Endocrinol, 2013. **375**(1-2): p. 1-9.

164. Kitagawa, A., Y. Ohta, and K. Ohashi, *Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rats.* J Pineal Res, 2012. **52**(4): p. 403-13.

165. Sartori, C., et al., *Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice.* Endocrinology, 2009. **150**(12): p. 5311-7.

166. Karatsoreos, I.N., et al., *Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse.* Endocrinology, 2010. **151**(5): p. 2117-27.

167. Oltmanns, K.M., et al., *Cortisol correlates with metabolic disturbances in a population study of type 2 diabetic patients.* Eur J Endocrinol, 2006. **154**(2): p. 325-31.

168. Takeshita, Y., et al., *Blockade of glucocorticoid receptors with RU486 attenuates cardiac damage and adipose tissue inflammation in a rat model of metabolic syndrome.* Hypertens Res, 2015. **38**(11): p. 741-50.

169. Lomax, M.A., et al., *Pigs fed saturated fat/cholesterol have a blunted hypothalamic-pituitary-adrenal function, are insulin resistant and have decreased expression of IRS-1, PGC1alpha and PPARalpha.* J Nutr Biochem, 2013. **24**(4): p. 656-63.

170. McNeilly, A.D., et al., *High fat feeding is associated with stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and reduced anxiety in the rat.* Psychoneuroendocrinology, 2015. **52**: p. 272-80.

171. Shin, A.C., et al., *Chronic exposure to a high-fat diet affects stress axis function differentially in diet-induced obese and diet-resistant rats.* Int J Obes (Lond), 2010. **34**(7): p. 1218-26.

172. Auvinen, H.E., et al., *The effects of high fat diet on the basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice.* J Endocrinol, 2012. **214**(2): p. 191-7.

173. Bonnard, C., et al., *Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice.* J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 789-800.

174. D'Alessandro, M.E., et al., *Time course of adipose tissue dysfunction associated with antioxidant defense, inflammatory cytokines and oxidative stress in dyslipemic insulin resistant rats.* Food Funct, 2015. **6**(4): p. 1299-309.

175. Ruiz-Ramirez, A., et al., *High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **301**(6): p. E1198-207.

176. Srividhya, S., M.K. Ravichandran, and C.V. Anuradha, *Metformin attenuates blood lipid peroxidation and potentiates antioxidant defense in high fructose-fed rats.* J Biochem Mol Biol Biophys, 2002. **6**(6): p. 379-85.

177. Holmstrom, K.M. and T. Finkel, *Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(6): p. 411-21.

178. Hotamisligil, G.S., *Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes.* Diabetes, 2005. **54 Suppl 2**: p. S73-8.

179. Ozcan, U., et al., *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes.* Science, 2004. **306**(5695): p. 457-61.

180. Marek, G., et al., *Adiponectin resistance and proinflammatory changes in the visceral adipose tissue induced by fructose consumption via ketohexokinase-dependent pathway.* Diabetes, 2015. **64**(2): p. 508-18.

181. Wang, H., et al., *Restoration of autophagy alleviates hepatic ER stress and impaired insulin signalling transduction in high fructose-fed male mice.* Endocrinology, 2015. **156**(1): p. 169-81.

182. Campbell, J.E., et al., *Regular exercise prevents the development of hyperglucocorticoidemia via adaptations in the brain and adrenal glands in male Zucker diabetic fatty rats.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **299**(1): p. R168-76.

183. Chavez, J.A. and S.A. Summers, *Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes.* Arch Biochem Biophys, 2003. **419**(2): p. 101-9.

184. Lee, J.S., et al., *Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites.* J Appl Physiol (1985), 2006. **100**(5): p. 1467-74.

185. Perez, I., et al., *Castration modifies aortic vasoreactivity and serum fatty acids in a sucrose-fed rat model of metabolic syndrome.* Heart Vessels, 2009. **24**(2): p. 147-55.

186. Lanfranco, F., et al., *Free fatty acids exert an inhibitory effect on adrenocorticotropin and cortisol secretion in humans.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(3): p. 1385-90.

187. Oh, Y.T., et al., *Regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis by circulating free fatty acids in male Wistar rats: role of individual free fatty acids.* Endocrinology, 2014. **155**(3): p. 923-31.

188. Yan, J., et al., *Enhanced autophagy plays a cardinal role in mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats: ameliorating effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate.* J Nutr Biochem, 2012. **23**(7): p. 716-24.

189. Cakir, I., et al., *Obesity induces hypothalamic endoplasmic reticulum stress and impairs proopiomelanocortin (POMC) post-translational processing.* J Biol Chem, 2013. **288**(24): p. 17675-88.